



Pontificia Universidad  
**JAVERIANA**  
Bogotá



CIENCIA Y TECNOLOGIA CON PROYECCION SOCIAL

**HOSPITAL  
UNIVERSITARIO  
SAN IGNACIO**



Fundación  
Santa Fe de Bogotá

# Diagnóstico de infiltración en SNC en leucemias y linfomas mediante citometría de flujo (CMF)

**SANDRA QUIJANO GÓMEZ MSc. PhD.**

**VII Curso de Actualización en Oncopatología y III Curso-Taller de  
Citometría de Flujo**

**Concepción-Chile 2019**

**[squijano@javeriana.edu.co](mailto:squijano@javeriana.edu.co)**

# Meningitis neoplásica

## \*Complicación asociada a peor pronóstico

Haïoun C . Ann Oncol 2000  
Hollender. Ann Oncol 2002  
Montoto S. Hematol Oncol Clin North Am 2005.  
Hegde U. Blood 2005.  
Bromberg J. Neurology 2007.

- Pacientes con **Cáncer**: 5%

DeAngelis LM. J Neuro Oncol 1998  
Chamberlain M. J. Neuro Oncol 2005

- Frecuencia variable:

\* Tumores sólidos: 4-15%



**Enfermedad sistémica avanzada** (90%)

\* Leucemias/Linfomas: 5-15%



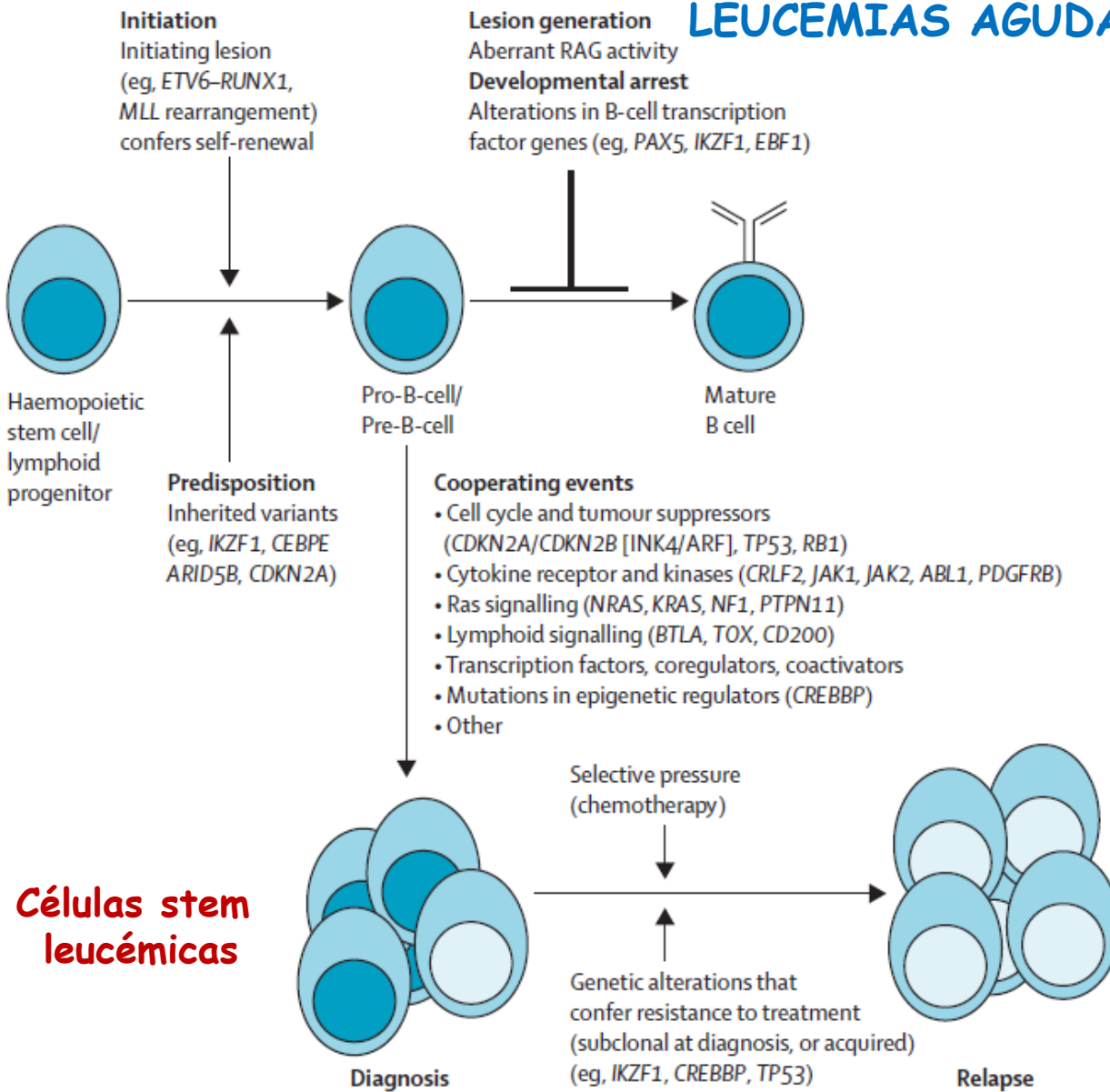
- Manifestación en pacientes **sin evidencia de enfermedad sistémica** (18% y 13%) o durante **periodos de remisión** (35% y 27%).

Chamberlain M. J of Neurol Oncol. 2005

- **Niños con LLA**: recurrencia en SNC en **>50%**. Reducción con profilaxis.

Alhluwalia M et al. Cancer 2012.

# LEUCEMIAS AGUDAS



Alteraciones genéticas asociadas al desarrollo de leucemia

- Bloqueo de la diferenciación celular
- Inhibición de apoptosis
- Modulación del microambiente y la respuesta inmune
- Cambios en el perfil metabólico
- Invasión y migración
- Resistencia al tratamiento

Figure 3: Genetic pathogenesis of B lymphoblastic leukaemia at diagnosis and relapse

# Rutas de señalización activadas por BCR-ABL

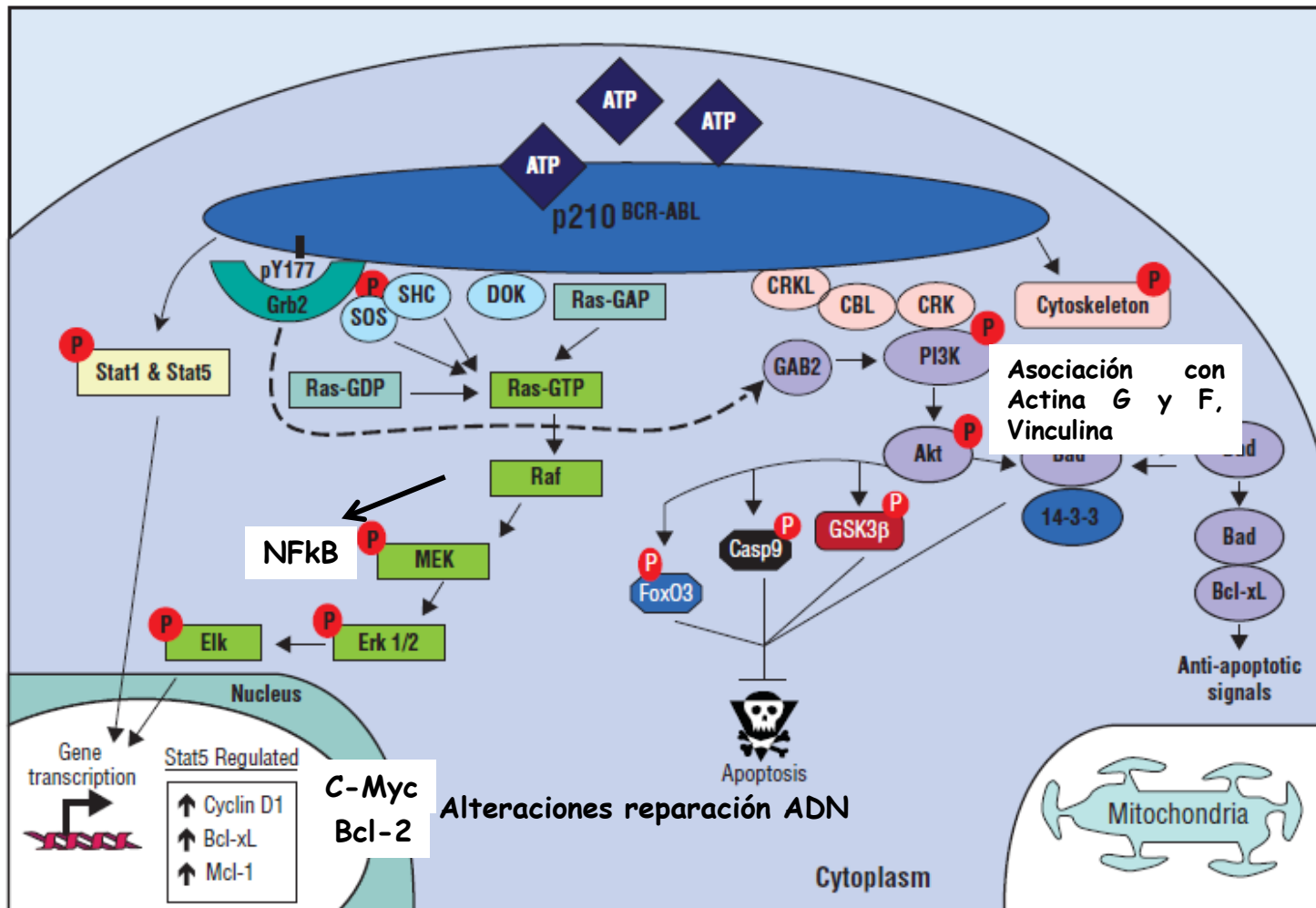
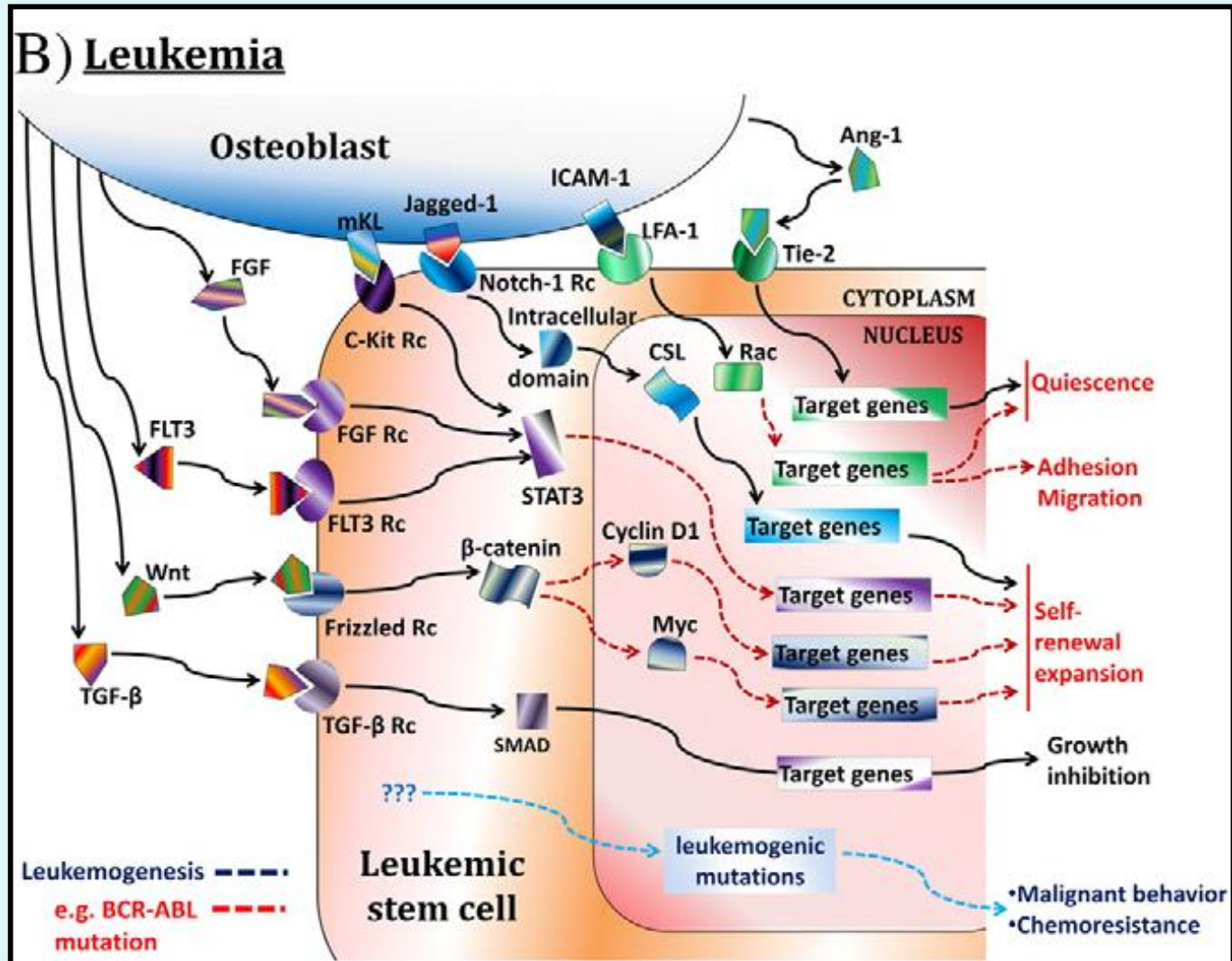


Fig 4. — BCR-ABL activates multiple downstream signaling pathways that contribute to growth and survival.

Proteínas con actividad tirosina quinasa → Transformación Maligna de células Stem

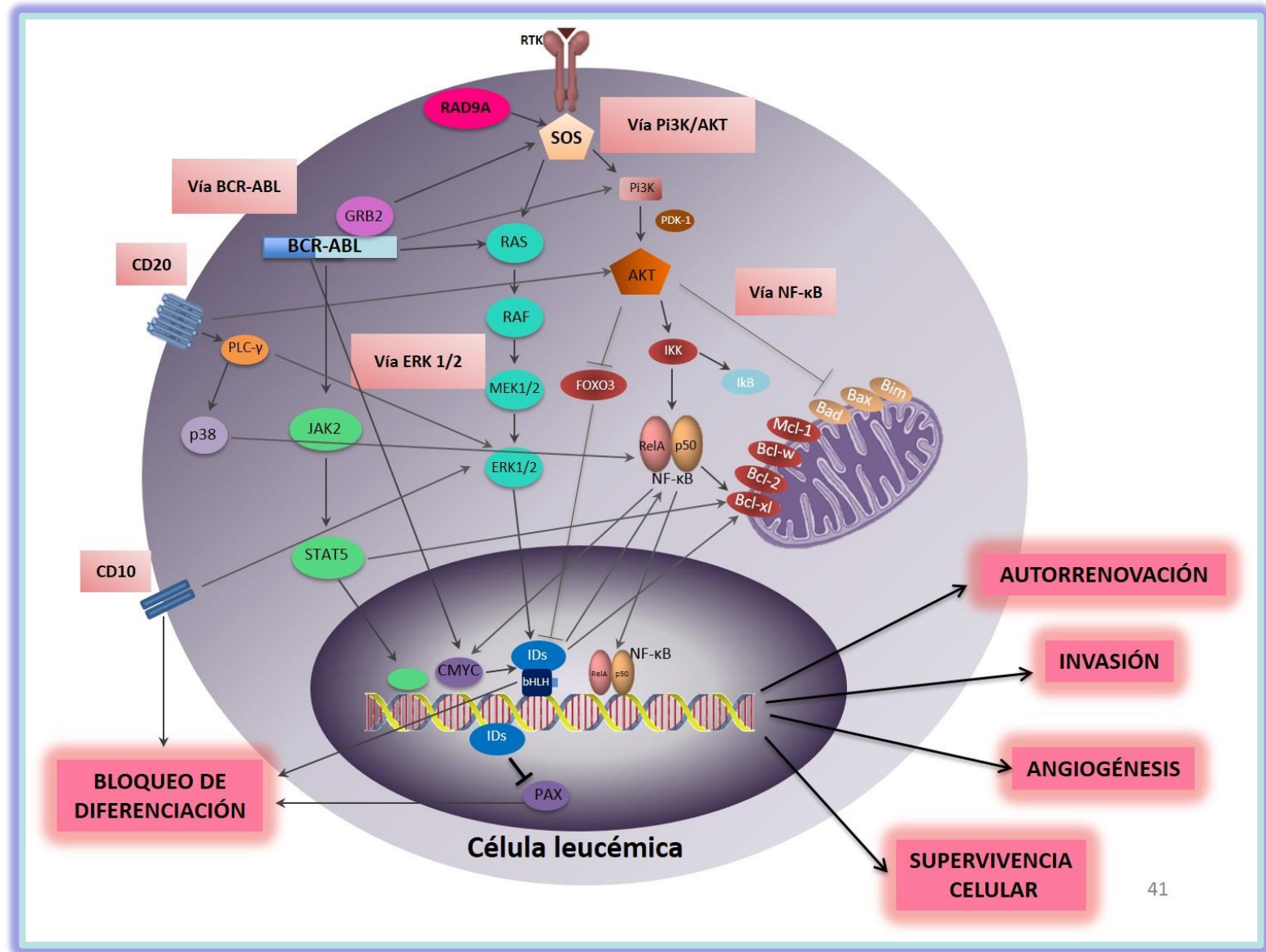
Hazlehurst L et al. Cancer Control 2009.

# Otras rutas de señalización activadas por BCR-ABL: papel del nicho

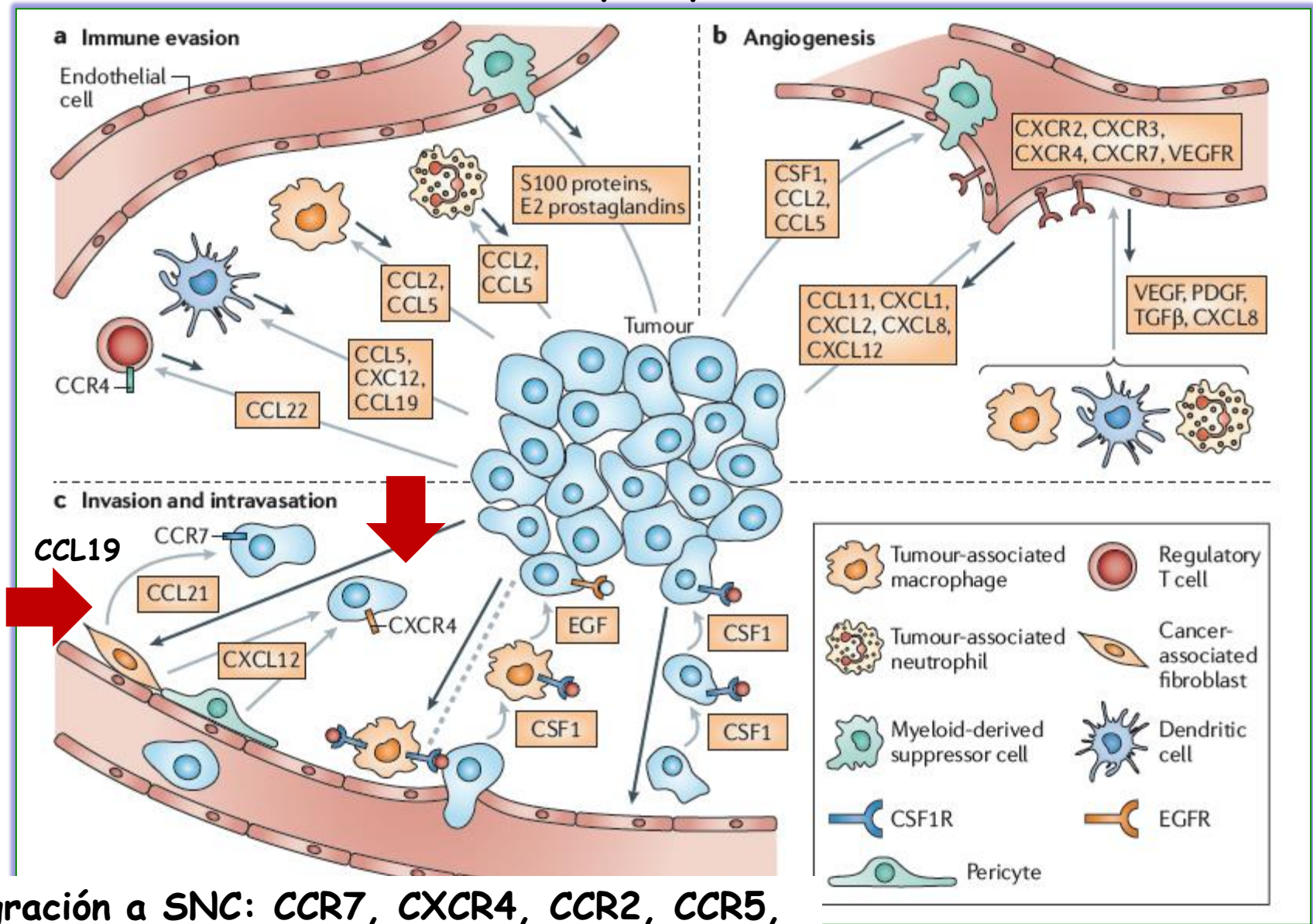




# Rutas de señalización que regulan la expresión de IDs en células leucémicas



# Microambiente tumoral y gradiente de quemoquinas: papel en migración tumoral y tropismo tisular



**Migración a SNC: CCR7, CXCR4, CCR2, CCR5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL6, CCL21, CXCL12**

# The Role of the Central Nervous System Microenvironment in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia

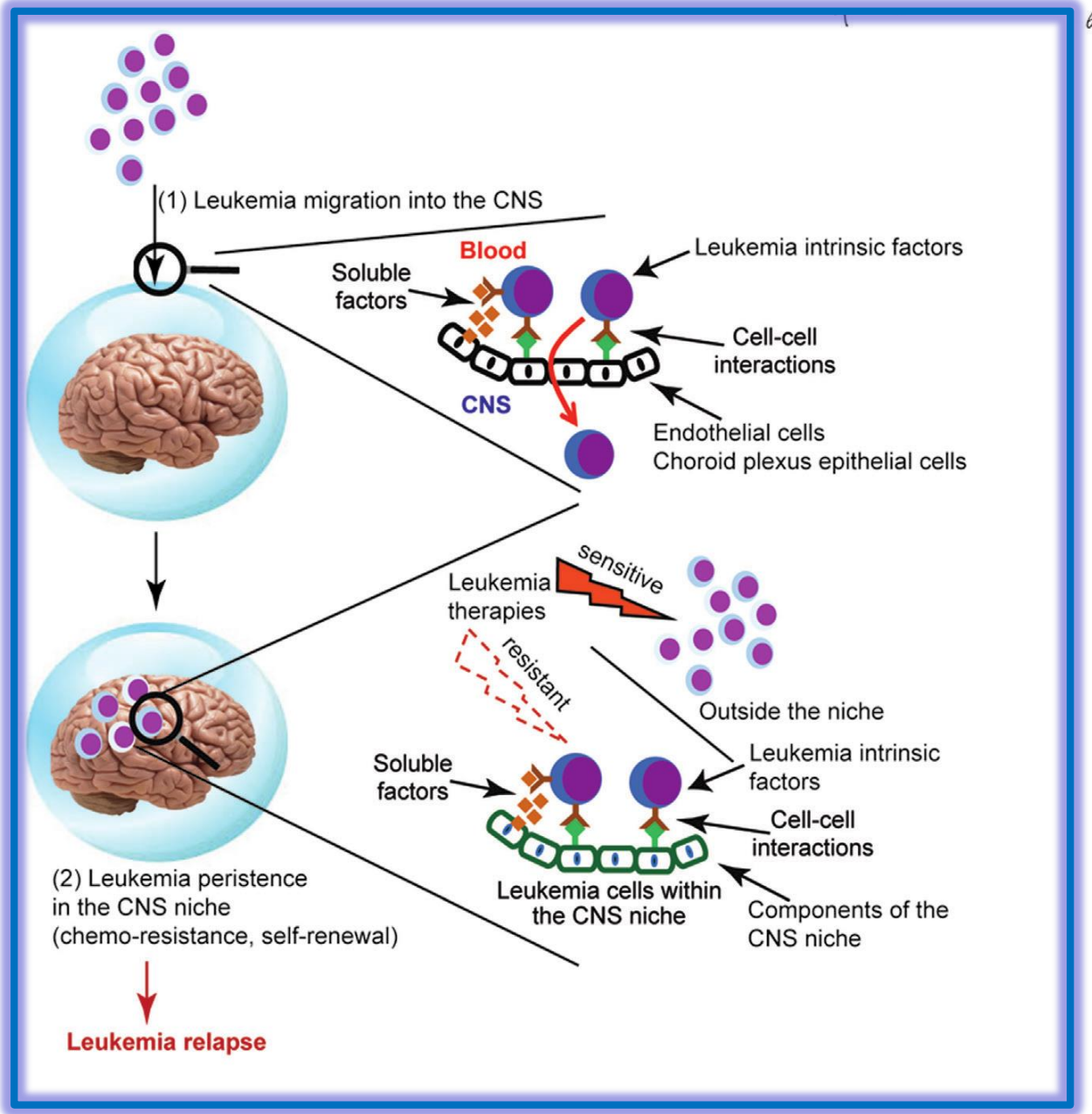
Gossai N and Gordon P.  
Frontiers in Pediatrics 2017.

**IL-15:**

- Tráfico a SNC.
- Sobre-expresión del ligando-1 de p-selectina (**PSGL-1**) y de **CXCR3** en células leucémicas: **migración de leucocitos a través de la BHE.**

**t(1;19):**

- Sobre-expresión del receptor de quinasa **Mer**
- **Compromiso en SNC** en modelos murinos de xenotrasplante.





# AFECCIÓN SECUNDARIA DE SNC EN LNH-B AGRESIVOS Y LEUCEMIAS

	LNH-B Agresivos	Leucemias agudas	Referencias
<b>Frecuencia</b>	<p>~20%</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Linfoma de Burkitt: 30-60%</li> <li>- Linfoma difuso de célula grande: 5-15%</li> </ul> <p>*LNH bajo grado: &lt;5%</p>	<p>3-5% (adultos LLA)</p> <p>5-10% (adultos con L.A. profilaxis en SNC)</p> <p>5-40% (recaída)</p>	<p>Surapaneni UR. Cancer 2002.</p> <p>Recht L. Neurologic Clinics. 2003</p> <p>Pui CH. Lancet 2008.</p>
<b>Criterios clínicos para predecir riesgo de recaída en SNC</b>	<p><b>-Subtipo Histológico:</b> LB, LBDCG, LL.</p> <p><b>-IPI</b> alto, edad y estadios avanzados, estado general deteriorado.</p> <p>-Afectación <b>extraganglionar:</b> MO, SP, senos paranasales, testículo, mama, pulmón, etc.</p> <p>- <b>&gt;2 áreas</b> extraganglionares.</p> <p>- <b>LDH</b> elevada.</p> <p>- LNH asociado a <b>HIV</b></p>	<p>- LLA-L3, LLA-T, LMMA</p> <p>- Alteraciones genéticas de <b>alto riesgo: t(9;22)</b></p> <p>- Expresión de <b>CD56</b></p> <p>- <b>Hiperleucocitosis</b></p> <p>- Enfermedad <b>extramedular</b></p> <p>- <b>Tasa proliferativa</b> elevada (S+G/M: &gt;14%)</p> <p>- <b>LDH</b> y <b>β2-m</b> elevadas</p>	<p>Chamberlain M. J. Neuro-Oncol. 2005</p> <p>Igarashi S. J. Clin Oncol. 2005.</p> <p>Pui CH. Lancet 2008.</p> <p>Hollender A. Ann. Oncol. 2002.</p> <p>Hegde U. Blood. 2005.</p> <p>Bromberg JE. Neutology 2007.</p> <p>Quijano S. J. Clin Oncol. 2009.</p> <p>Langerak AW. Leukemia 2012.</p>

# Immune Surveillance of the Human Central Nervous System (CNS): Different Migration Pathways of Immune Cells Through the Blood–Brain Barrier and Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier in Healthy Persons

Tilman O. Klein<sup>1</sup> and Ludwig Benes<sup>2</sup>

Cytometry Part A 69A:147–151 (2006)

Table 2

*Recruitment of Blood-Borne Lymphocytes into CNS. Migration Pathways of Lymphocyte Subsets Through the Blood–CSF Barrier (BCSFB) Using Different Cell Adhesion Molecules (CAMs) of Lymphocyte–Endothelial Interactions<sup>a</sup>*

(a) CAMs of lymphocyte–endothelium interactions in choroid plexus microvessels of healthy persons<sup>b</sup>

Choroid plexus	Expression	Expression on lymphocytes
Micro vessels epithelium	Junction adhesion molecules (JAMs)	CD18 (integrin $\beta$ 2 subunit)
Micro vessels	CD34 (Sgp90) (CD15s (sLe <sup>x</sup> ))	L-selectin
	PECAM-1 (CD31) (CD62L)	Integrin $\alpha$ V $\beta$ 3 (CD51/CD61)
Small vessels	ICAM-1	LFA-1 (CD11a/CD18)
Large venules	ICAM-1	CD11b/CD18 (Mac-1)
Large venules	P-selectin (CD62P)	CD162 (P-selectin glycoprotein ligand 1)
	E-selectin (CD62E)	CD162 (P-selectin glycoprotein ligand 1)

**“Estos patrones de migración son anormales en células tumorales”  
Son dependientes de las alteraciones genéticas y rutas de señalización en la célula tumoral**

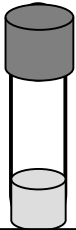
# Citometría de Flujo y detección de enfermedad leptomeníngea en LCR

# Limitaciones de la CMF en la detección de enfermedad leptomeníngea en LCR

- Bajo número de células
- Baja concentración celular
- Escasa viabilidad celular
- Escaso volumen de muestra
- Contaminación con SP



# Recomendaciones técnicas para el estudio de muestras de LCR por CMF



Volumen de muestra

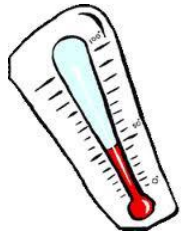
Ideal: 2-5 mL

Algunos reportes: 10-15 mL



Muestras no estabilizadas

Inmediato/antes de la primera hora/  
máximo 3 horas

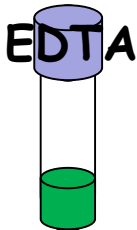


Muestras + medio de cultivo + **BSA 0.5%**  
ó medio + **SFB 10%**  
Preserva células entre  
5-24 horas

Mantener 4°C



LCR + RPMI +  
**SFB 10%**  
Mantener a temperatura ambiente (21-23°C)  
Procesadas máximo  
2 horas post-obtención



Muestras Estabilizadas con  
**Transfix**  
dilución final 1/10  
Hasta 48-72 horas  
SP: recuento de linfocitos  
Estabilidad > 10 días

Subira D. Am J Clin Pathol 2002  
Enting RH. Cancer Treat Res. 2005  
Petzold A. Neurocit Care. 2006  
Kraan J. Curr Protoc Cytom 2008  
Quijano S. J Clin Oncol. 2009  
de Graaf MT. Cytometry B Clin Cytom 2011  
Langerak AW. Leukemia 2012  
Tembhare P. Am J Clin Pathol 2012

**Original Article**

# Use of TransFix™ Cerebrospinal Fluid Storage Tubes Prevents Cellular Loss and Enhances Flow Cytometric Detection of Malignant Hematological Cells After 18 Hours of Storage

Adriaan H. de Jongste,<sup>1,2</sup> Jaco Kraan,<sup>1</sup> Patricia D. van den Broek,<sup>1</sup>  
Rik A. Brooimans,<sup>1</sup> Jacoline E. Bromberg,<sup>2</sup> Kees A. van Montfort,<sup>3</sup>  
Peter A. Sillevs Smitt,<sup>2</sup> and Jan W. Gratama<sup>1\*</sup>

**Transfix:** Previene muerte celular por **incremento del pH**, contiene **aldehído alifático (AA)** (fija por entrecruzamiento de res de a.a.) + **sales de metal pesado** (estabiliza leucocitos y reduce autofluorescencia causada por AA).  
Barnett D. Patent WO 95/01796; 1995.

**Objetivo:** Comparar el efecto del **Transfix** en los **recuentos celulares** y en la **detección de células tumorales** (malignidades hematológicas) en LCR.

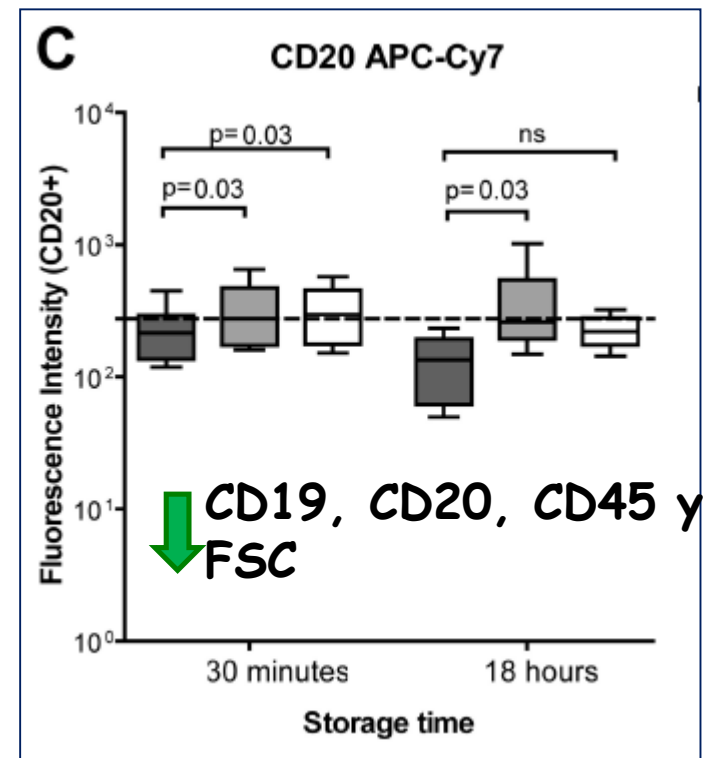
- Comparación entre **Transfix** con **LCR nativo** y **LCR + RPMI + SFB 5%**
- Tiempos: **30 minutos y 18 horas**

**Detección de LHM:** Se encuentra concordancia entre Transfix vs. LCR nativo (>80%) y vs. LCR + SFB (>90%)

Table 4  
*Detection of LHM After 18 Hours: TransFix vs. Native CSF*

<i>t</i> = 18 hours	Native			Total
	Positive	Suspicious	Negative	
TransFix™				
Positive	23	6	5	34
Suspicious	0	0	2	2
Negative	0	0	63	63
Total	23	6	70	99

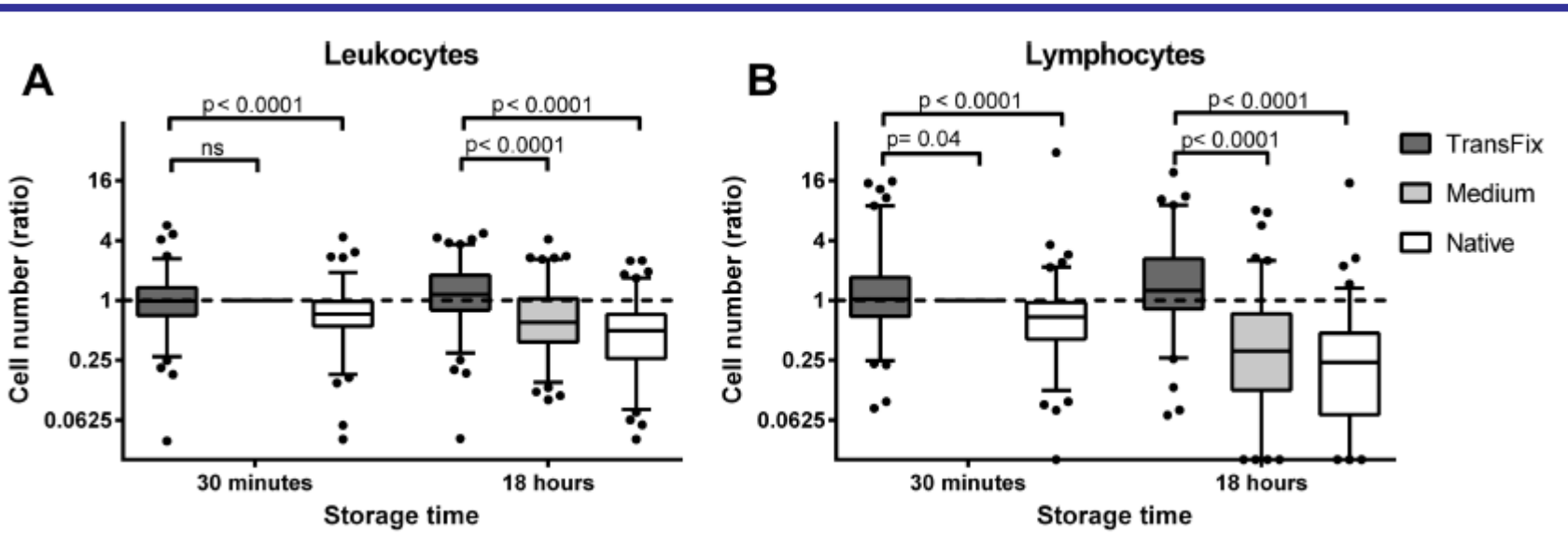
*P* = 0.005 (McNemar test).



**N° de leucocitos:**

30 min: 1.4x superior vs. LCR Nativo

18 horas: 1.8x superior vs. LCR + SFB y 2.3x vs. LCR Nativo



# Número de células en LCR

## Recuento normal

<5 leucocitos/uL

## Meningitis bacteriana

- Recuentos oscilan entre: <100/uL (fases tempranas) hasta 60.000/uL
- Predominio de PMN (90-95%)

## Meningitis viral

- Recuentos oscilan entre: 10/uL hasta >1000/uL
- Predominio de MNC

## Esclerosis Múltiple

- 75% de los casos: recuentos normales
- 25%: pleiocitosis

Table 1

Reference Values of WBC Subsets in CSF (Adapted from Ref. 40)

Subset	Absolute number <sup>a</sup>
Leukocytes	1.12 (0.40–3.17)
Granulocytes	0.08 (0.02–0.43)
Monocytes	0.23 (0.08–1.11)
Lymphocytes	0.66 (0.16–1.88)
T cells	0.62 (0.15–1.83)
CD4 <sup>+</sup> T cells	0.44 (0.08–1.43)
CD8 <sup>+</sup> T cells	0.13 (0.04–0.40)
NKT cells	0.01 (0.00–0.06)
B cells	0.00 (0.00–0.03)
NK cells	0.01 (0.00–0.05)
Dendritic cells	0.04 (0.01–0.18)
Myeloid	0.02 (0.00–0.13)
Plasmacytoid	0.01 (0.00–0.03)

<sup>a</sup>Medians (5th–95th percentiles) of absolute numbers  $\times 10^6/L$  are given.

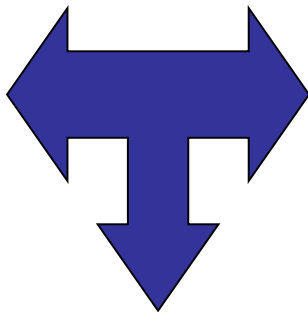
de Graaf MT et al. Cytometry B Clin Cytom 2010.

de Graaf MT et al. Cytometry B Clin Cytom 2011.



# Rastreo diagnóstico de meningitis neoplásica

**Presentación**  
(síntomas y signos  
neuroológicos relacionados con  
infiltración meníngea) >90%



**Técnicas de imagen**  
(TAC, RMN, PET)  
40-60%

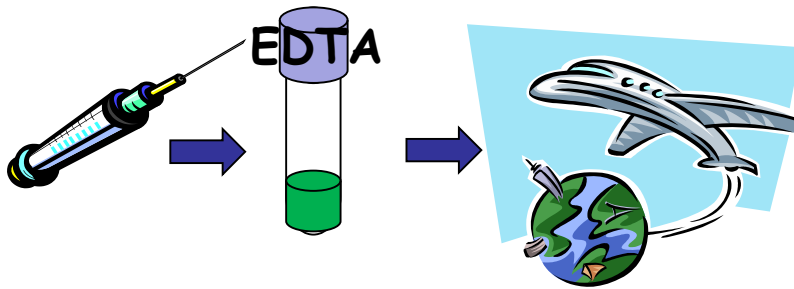
**Punción lumbar**  
(Citología del LCR: 20-  
60% de falsos negativos)



**Limitación: escasa sensibilidad y/o especificidad**  
**DIAGNÓSTICO SUBÓPTIMO:**  
**CMF mayor sensibilidad**

# Fase pre-analítica

## 1. Muestras de LCR estabilizadas (Transfix, Immunostep SL)

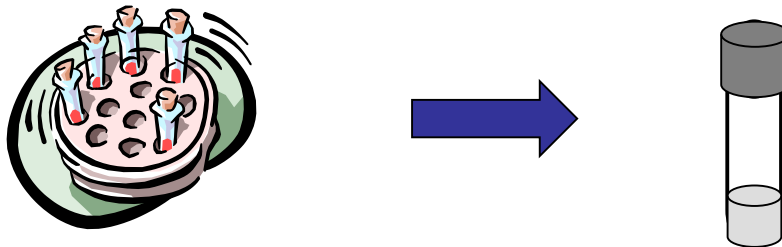


Previene pérdida celular por periodos  
Superiores a 24-48 horas (10 días) (MO y SP)  
LCR: mantiene celularidad 48-72h a 2-8°C

Canonico B et al. J Immunol Methods 2004  
Quijano et al. J. Clin Oncol. 2009  
Kraan J, Orfao A, Quijano S et al. Current  
Protocols Cytometry 2008

# Fase analítica

## 2. Centrifugar (1x) y concentrar (300 µL) de la muestra

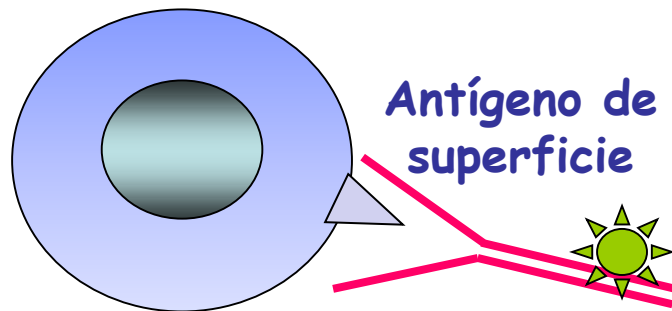


(Quijano S et al. J Clin Oncol. 2009)

# ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LCR DE LINFOMAS AGRESIVOS MEDIANTE CMF

Marcaje celular de 1/3 de la muestra

FITC	PE	PERCPCy5.5	PECy7	APC	APCCy7
CD8-sIgλ	CD56-sIgκ	CD4-CD19	CD3	CD20	CD45



Quijano S et al. J Clin Oncol 2009

Adicionar esferas PerfectCOUNT (Cytognos SL) y Medir (Citómetro de flujo)

(Quijano S et al. J Clin Oncol. 2009)

**Negativo**



Marcar de nuevo las  
2/3 partes restantes  
de muestra

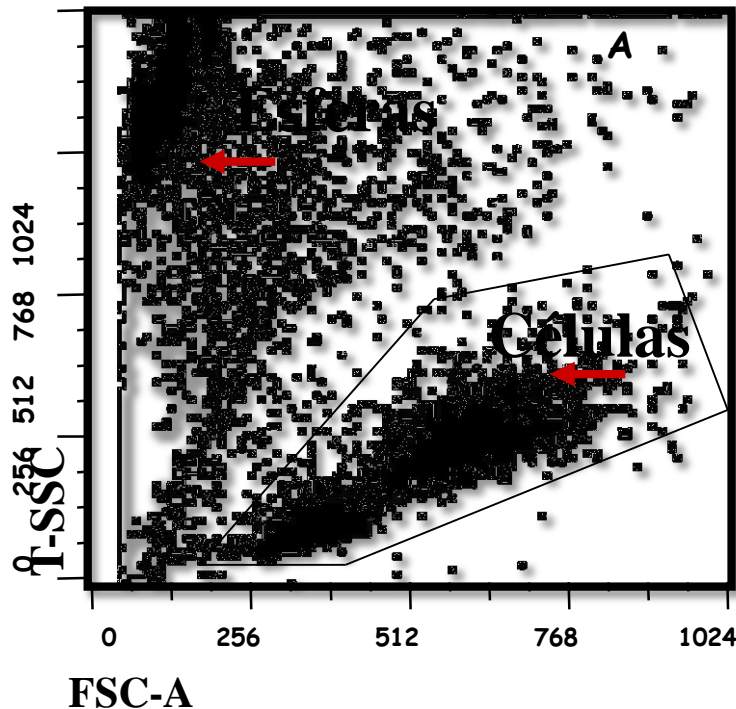
**Positivo**



Panel adaptado al  
fenotipo del LNH-B

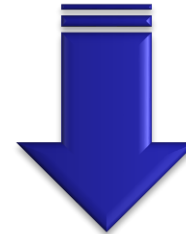
# CÁLCULO DE POBLACIONES CELULARES

Valores relativos y absolutos de poblaciones celulares



Muestra de LCR.

Calcular el número absoluto  
total de células en  
muestra/ $\mu\text{l}$



$$\left[ \frac{\# \text{células engate}}{\# \text{microesferas engate}} \times \frac{\# \text{microesferas añadidas por tubo}(a)}{\text{volumen de muestra}(uL)(b)} \times \text{factor de conversión}(c) = \text{células} / uL \right]$$



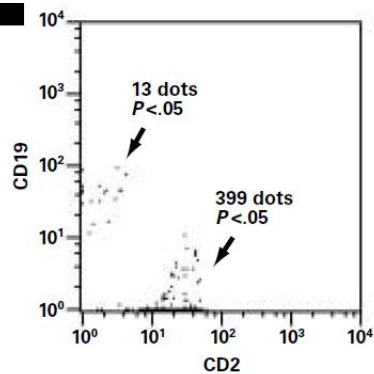
# Recomendaciones técnicas para el estudio de muestras de LCR por CMF

## Definición de una población celular

Subira D et al. Am J Clin Pathol 2002

Mínimo **13 eventos**

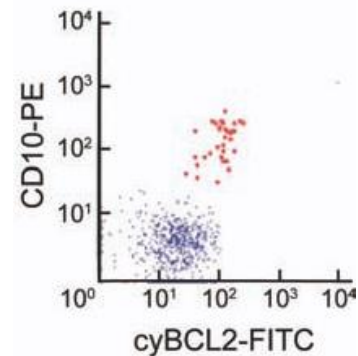
Combinaciones de **3** fluorescencias



Quijano S et al. J Clin Oncol. 2009

Mínimo **10 eventos**

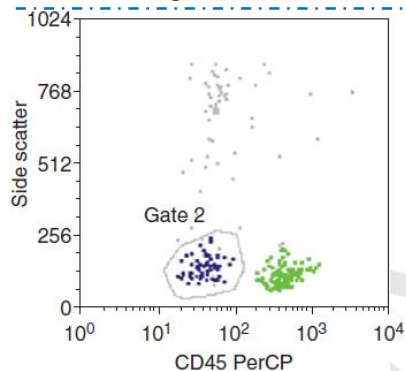
Combinaciones de **6** fluorescencias



Kraan J et al. Curr Protoc Cytom 2008

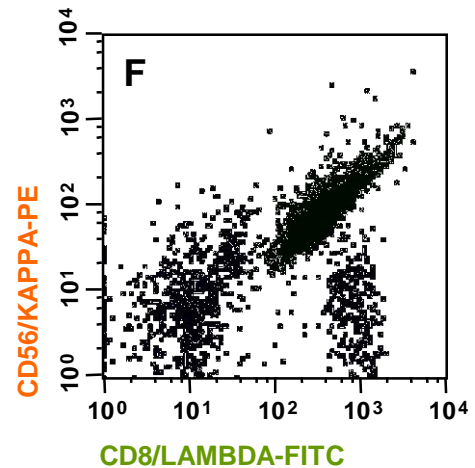
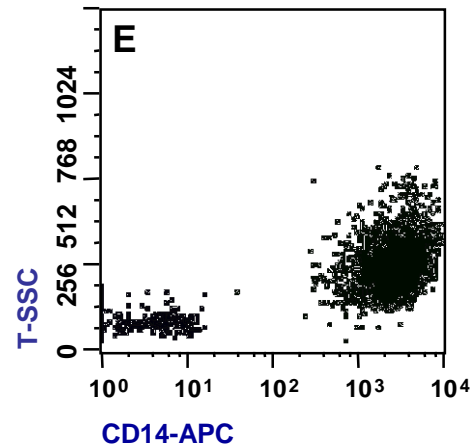
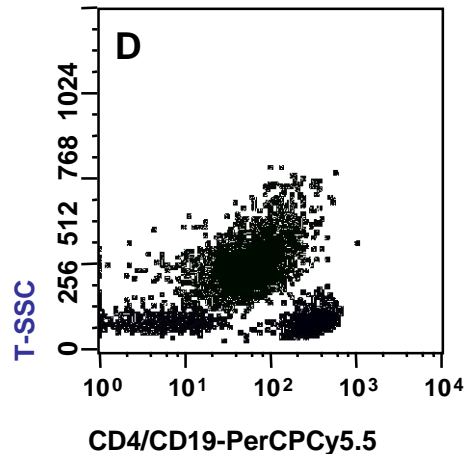
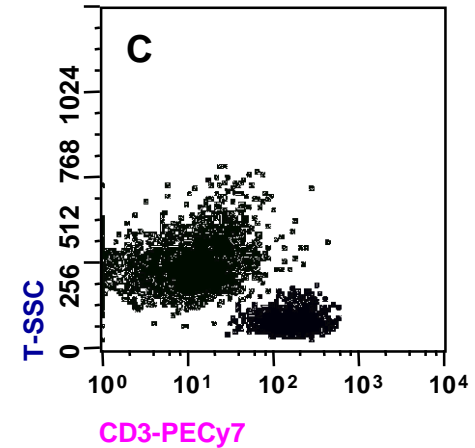
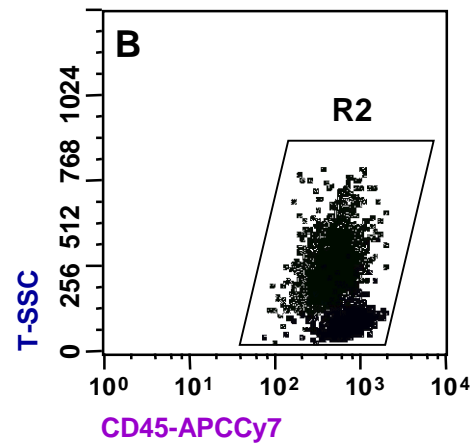
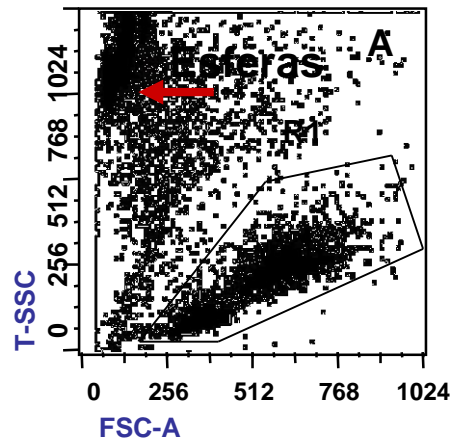
>**25 eventos**: positivo  
**10-25 eventos**: sospechoso  
<**10 eventos**: negativo

"Sensibilidad para definir el número mínimo de eventos **depende** del número de parámetros evaluados"  
**Ideal >4 fluorescencias**



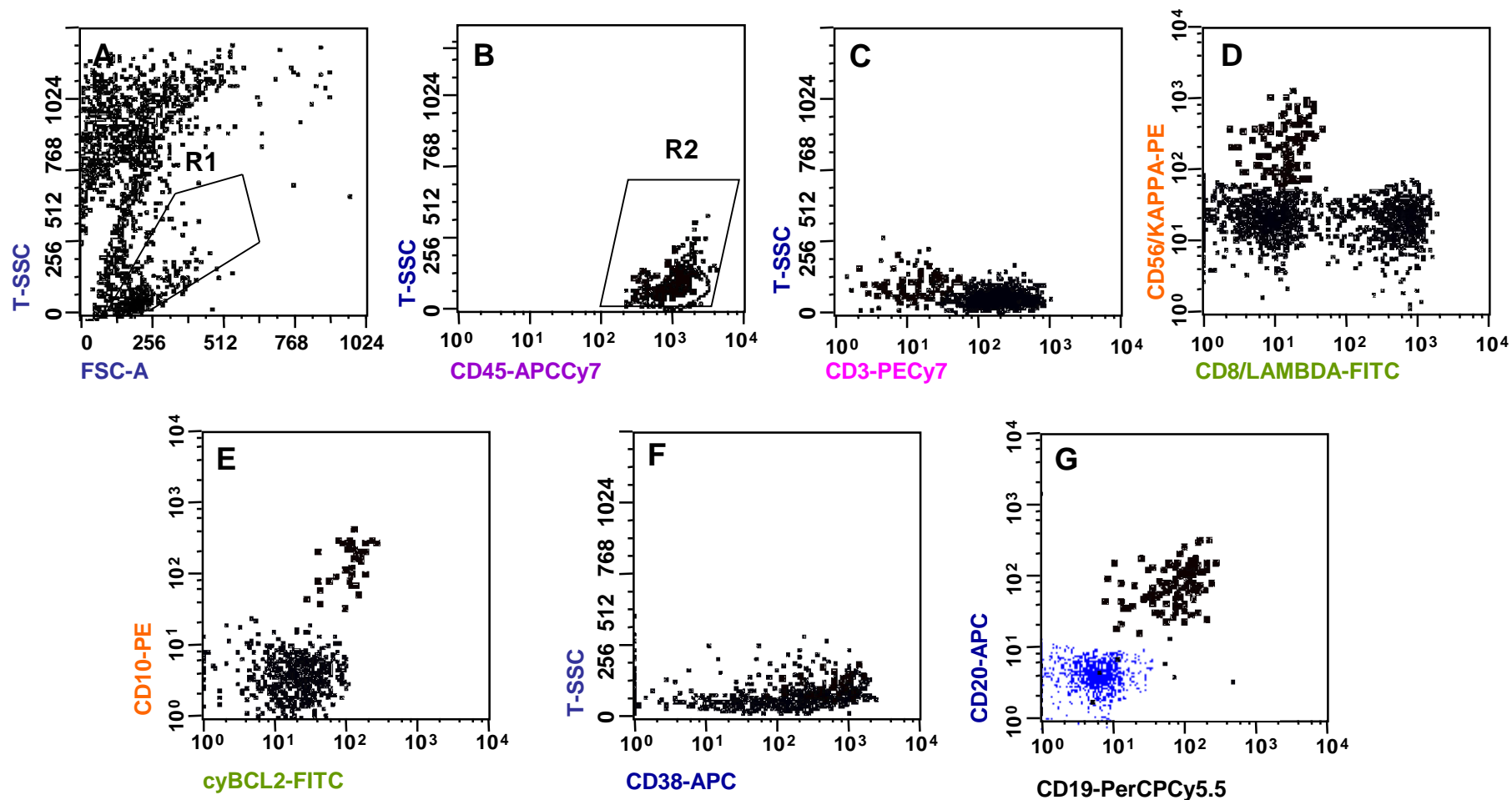
de Graaf MT. Cytometry B Clin Cytom 2011

# MUESTRA DE LCR REACTIVA DE UN PACIENTE CON LBDCG

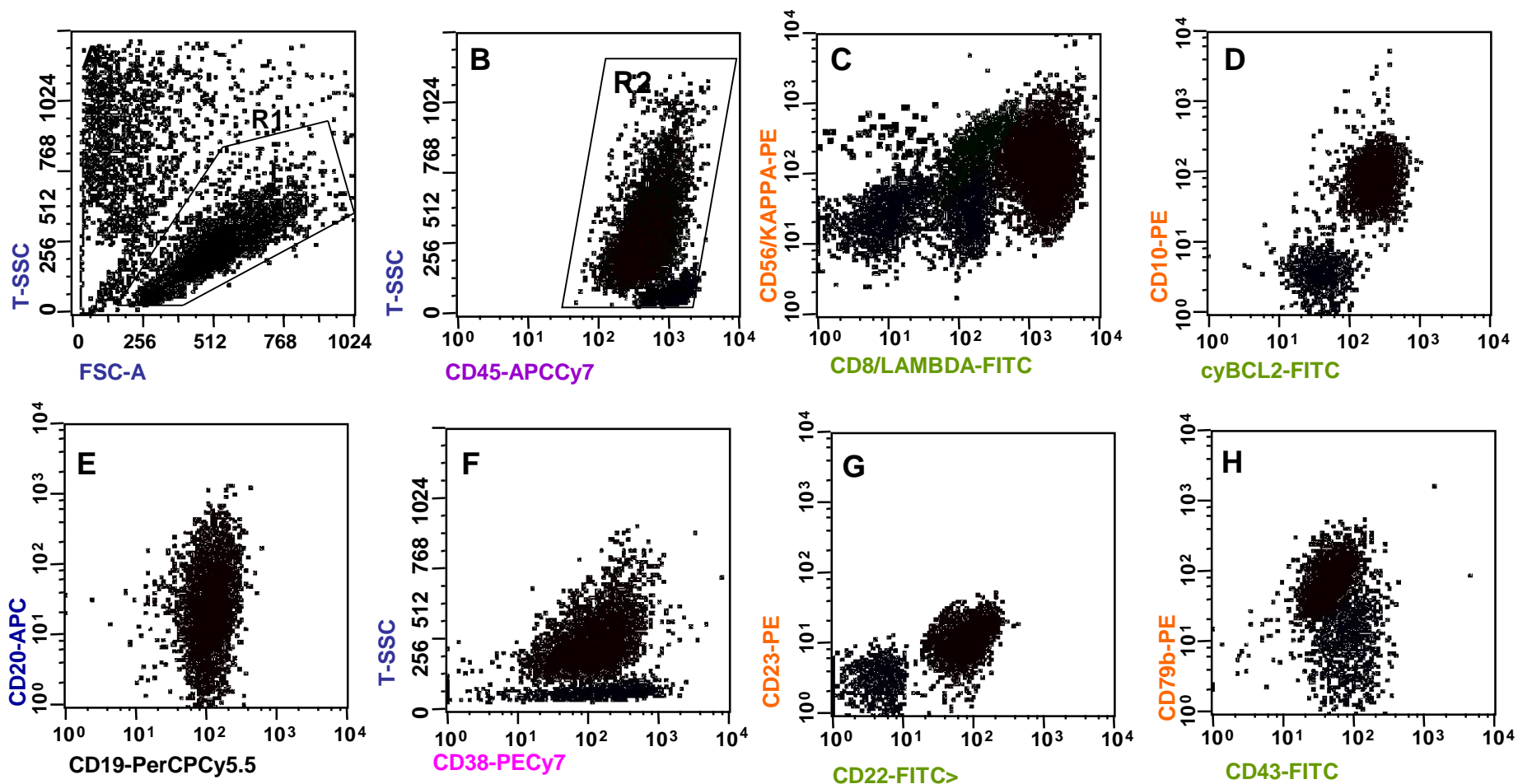


■ Células T    ■ Monocitos

# ENFERMEDAD LEPTOMENÍNGEA EN UN PACIENTE CON LBDCG (LF-+) Y BAJO NIVEL DE INFILTRACIÓN DE LCR



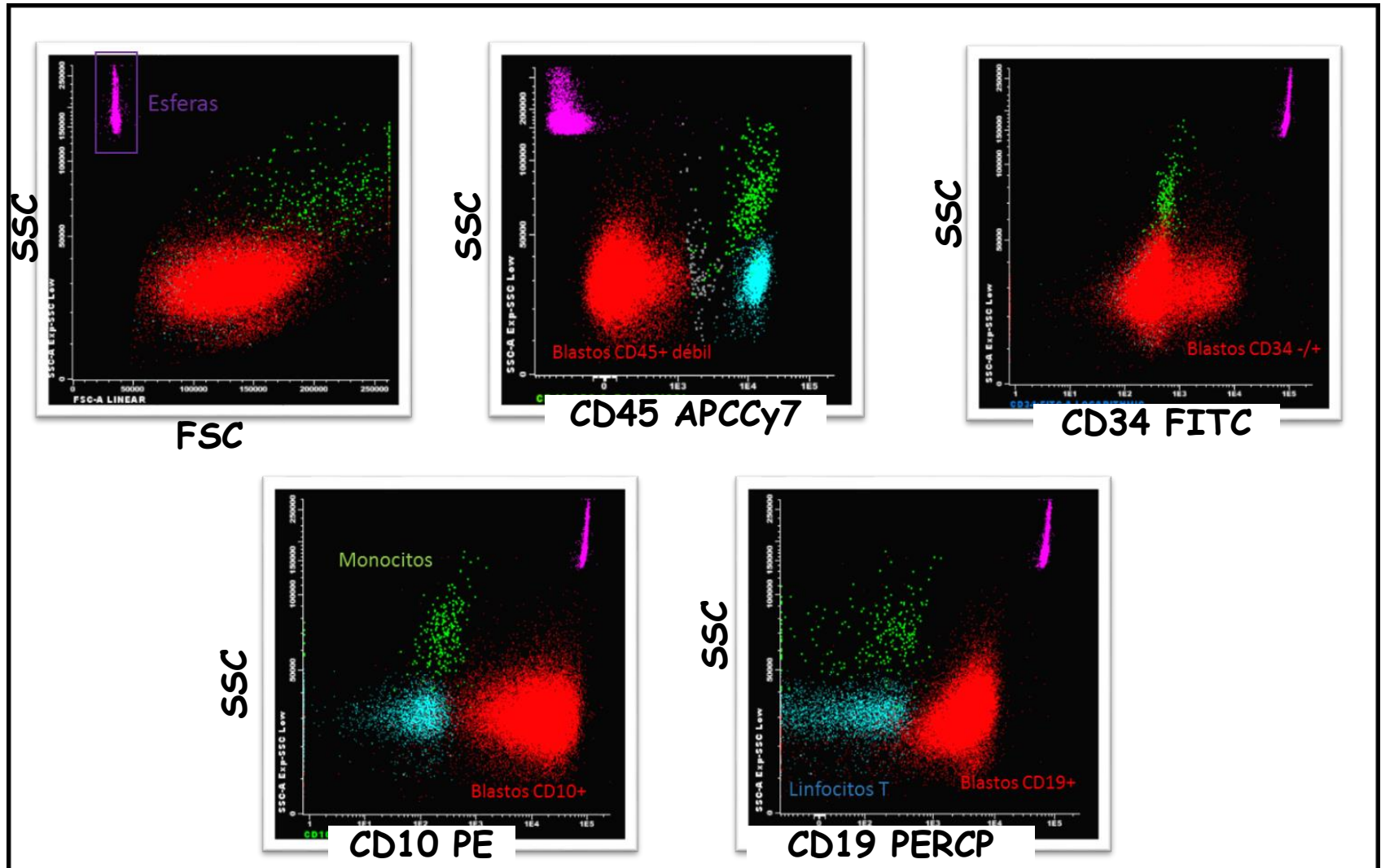
# ENFERMEDAD LEPTOMENÍNGEA EN UN PACIENTE CON LBDCG (LF-t) e INFILTRACIÓN ELEVADA DEL LCR



■ Células T   ■ Células NK   ■ Monocitos   ■ Células B patológicas (78%)



# Muestra de LCR de un paciente con LLA-B positiva por CMF y sospechosa de infiltración por CC



Perl

Células T

Monocitos

Blastos (92,4%; 638 células/uL)

# ESTUDIO DE MENINGITIS NEOPLASICA: CMF versus CITOLOGIA

**Table 1.** Comparison of FC and CC for the Detection of Malignant Lymphocytes in the CSF of Patients With Hematological Malignancies

Study	No.	Sensitivity	
		Positive FC No.	Positive CC No.
Hegde 2005 <sup>19</sup>	51	11 (22%)	1 (2%)
Di Noto 2008 <sup>26</sup>	42	11 (26%)	4 (9.5%)
Quijano 2009 <sup>20</sup>	123	27 (22%)	7 (6%); suspicious in 3 (2%)
Bromberg 2007 <sup>27</sup>	219	44 (73%) <sup>a</sup>	19 (32%)
Schinstine 2006 <sup>28</sup>	32	19 (59%)	Repeat cytology: 9 (47% of 19)

La mayoría de estudios incluyen  
pacientes de **nuevo diagnóstico**

## Patient Population (Inclusion Criteria)

### High risk of CNS disease:

- DLBCL with either  $\geq 2$  extranodal sites and  $\uparrow$  LDH or bone marrow involvement

- BL

- AIDS-related lymphoma

### High risk of CNS disease:

- DLBCL, BV-MCL, B-LBL, or T-LBL with either  $\geq 2$  extranodal sites and  $\uparrow$  LDH or bone marrow involvement

- BL

### High risk of CNS disease:

- Aggressive B-NHL with either infiltration of extranodal sites (testis, breast, paranasal sinus, and/or bone marrow), neurological symptoms, or  $\uparrow$  LDH

Patients who underwent CSF evaluation for hematological malignancy

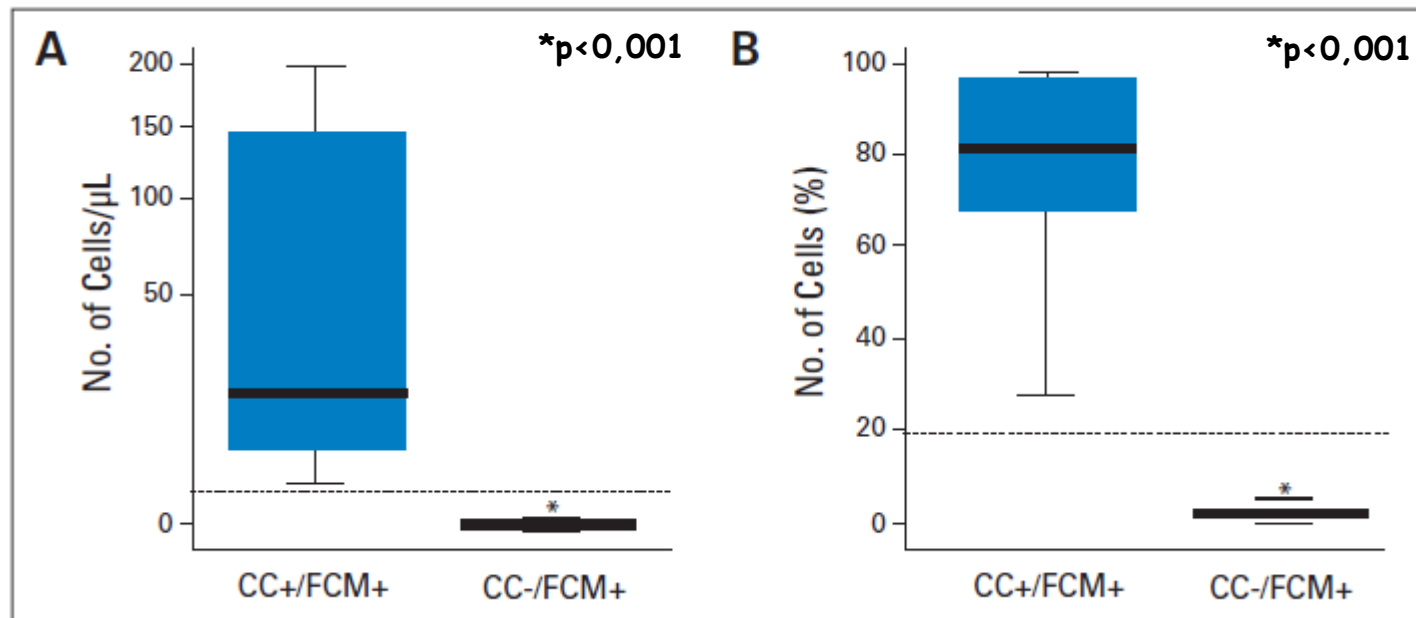
Patients with an initial CSF diagnosis of "atypical" or "suspicious"

**29 hospitales en España**

Abbreviations: AIDS, acquired immunodeficiency syndrome; BL, Burkitt lymphoma; B-LBL, B-cell precursor lymphoblastic lymphoma; B-NHL, B-cell non-Hodgkin lymphoma; BV-MCL, blastoid variant of mantle cell lymphoma; CC, conventional cytology; CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FC, flow cytometry; LDH, lactate dehydrogenase; T-LBL, T-cell lymphoblastic lymphoma.

<sup>a</sup>Sixty of the original 219 patients had positive FC and/or CSF cytology.

# FRECUENCIA DE CÉLULAS B NEOPLÁSICAS EN MUESTRAS DE LCR INFILTRADAS POR CMF



(Quijano S et al. J Clin Oncol. 2009)

Punto de corte CC:  $>20\%$  y  $>1$  célula B neoplásica/ $\mu$ L

CMF detecta rango de 0.01%-99% de células neoplásicas

Otros trabajos el punto de corte para la CC es de mínimo 5% de células neoplásicas.

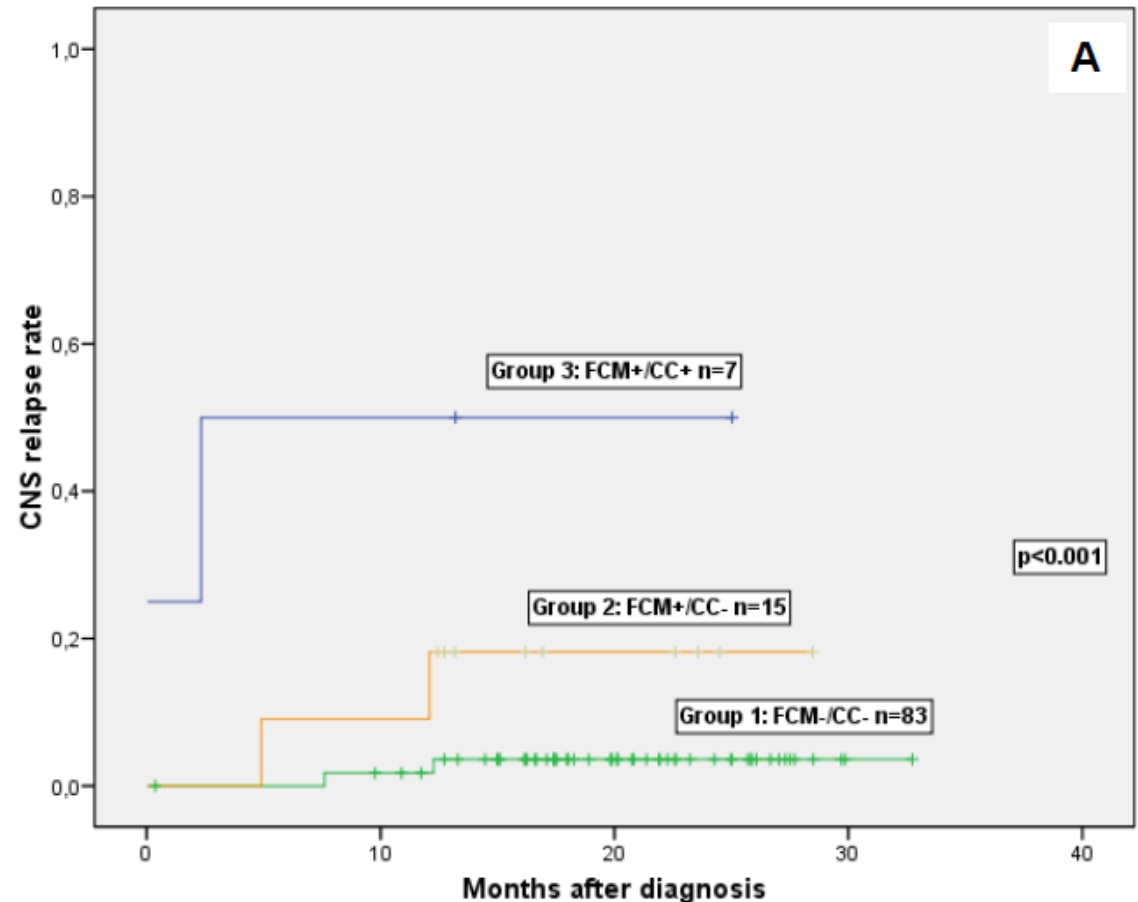
(Levin N et al. J Neurooncol. 2008)

# Clinical significance of occult cerebrospinal fluid involvement assessed by flow cytometry in non-Hodgkin's lymphoma patients at high risk of central nervous system disease in the rituximab era

Juan-Manuel Sancho<sup>1</sup>, Alberto Orfao<sup>2</sup>, Sandra Quijano<sup>2</sup>, Olga García<sup>1</sup>, Carlos Panizo<sup>3</sup>, Elena Pérez-Ceballos<sup>4</sup>, Guillermo Deben<sup>5</sup>, Antonio Salar<sup>6</sup>, Eva González-Barca<sup>7</sup>, Natalia Alonso<sup>8</sup>, Jose-Antonio García-Vela<sup>9</sup>, Javier Capote<sup>10</sup>, Francisco-Javier Peñalver<sup>11</sup>, Mariano Provencio<sup>12</sup>, Jesús Arias<sup>13</sup>, Josefa Plaza<sup>14</sup>, Dolores Caballero<sup>15</sup>, Marta Morado<sup>16</sup>, Evarist Feliu<sup>1</sup>, Josep-Maria Ribera<sup>1</sup>; for the Spanish Group for the Study of CNS Disease in NHL.

European J. Hematology 2010; 85 (4): 821-8.

Seguimiento: 105/123 (85%)  
20 meses (rango 10-33 meses)



Seguimiento: 105/123 (85%)  
20 meses (rango 10-33 meses)

CSF STATUS	INDICATION FOR IT THERAPY ADMINISTRATION	TOTAL PATIENTS (n = 105)	PATIENTS WITH CNS RELAPSE/ PROGRESSION
FCM - CC - (n = 83)	No prophylaxis (n=22)	22	-
	Prophylaxis (n=59)		
	• TIT	46	1
	• Methotrexate	1	-
	• Methotrexate and cytarabine	2	-
	• Liposomal cytarabine	10	-
	Active therapy (n=2)*		
FCM + CC - (n = 15)	• Liposomal cytarabine	2	1
	No prophylaxis (n=1)	1	-
	Prophylaxis (n=7)		
	• TIT	5	-
	• Cytarabine	1	-
	• Liposomal cytarabine	1	-
	Active therapy (n=7)		
FCM + CC + (n = 7)	• TIT	1	-
	• Liposomal cytarabine	6	2
	No prophylaxis (n=0)	-	-
	Prophylaxis (n=0)	-	-
	Active therapy (n=7)		
	• TIT	3	1
	• Liposomal cytarabine	4	1

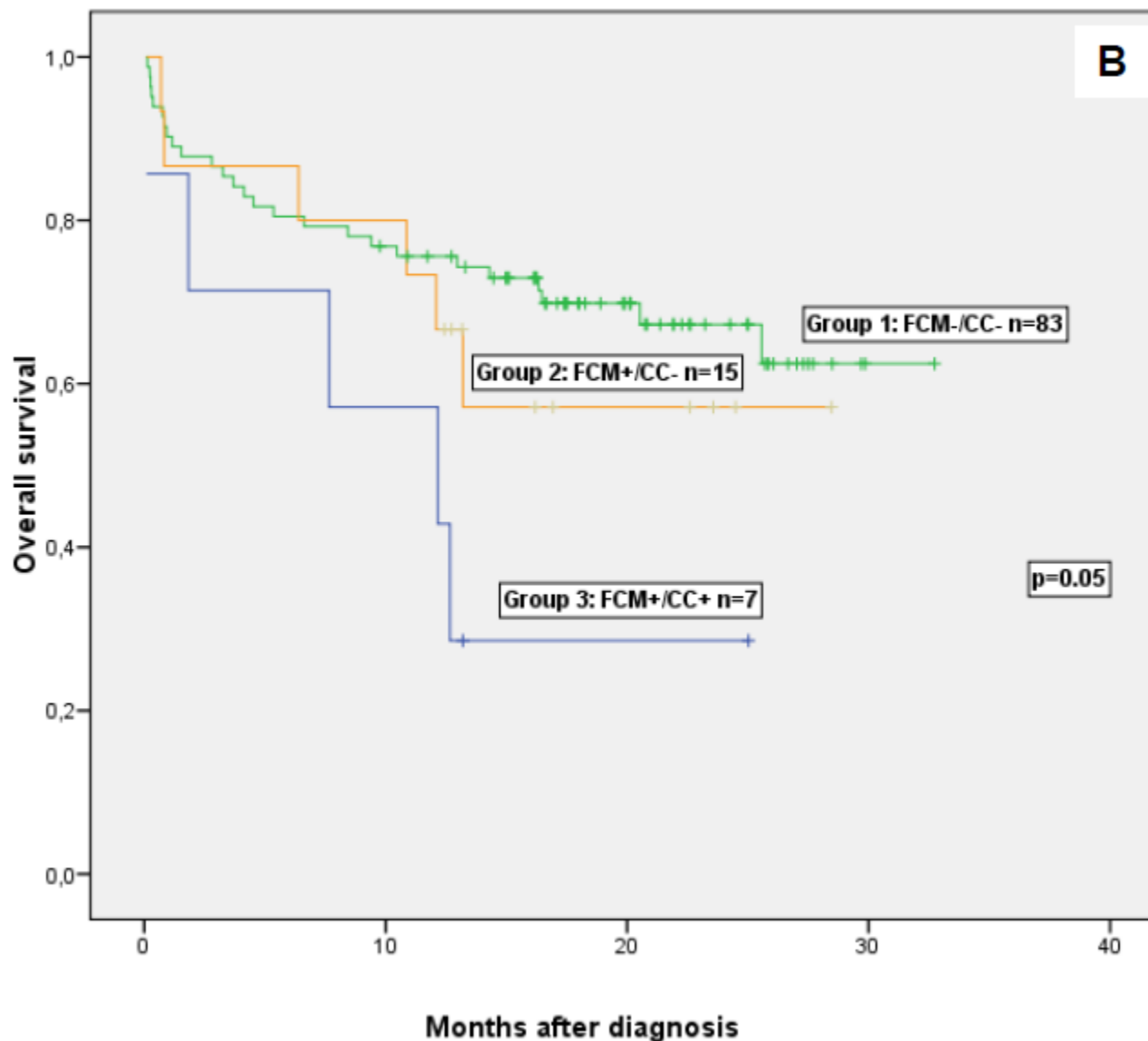
2.4%

13%

28.5%

p < .05

# ANALISIS DE SUPERVIVENCIA TOTAL DURANTE EL SEGUIMIENTO





# Detection and outcome of occult leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma

Wyndham H. Wilson,<sup>1</sup> Jacoline E.C. Bromberg,<sup>2</sup> Maryalice Stetler-Stevenson,<sup>1</sup> Seth M. Steinberg,<sup>1</sup> Lourdes Martin-Martin,<sup>3</sup> Carmen Muñiz,<sup>3</sup> Juan Manuel Sancho,<sup>4</sup> Maria Dolores Caballero,<sup>3</sup> Marjan A. Davidis,<sup>5</sup> Rik A. Brooimans,<sup>6</sup> Blanca Sanchez-Gonzalez,<sup>7</sup> Antonio Salar,<sup>7</sup> Eva González-Barca,<sup>8</sup> Jose Maria Ribera,<sup>4</sup> Margaret Shovlin,<sup>1</sup> Armando Filie,<sup>1</sup> Kieron Dunleavy,<sup>1</sup> Thomas Mehrling,<sup>9</sup> Michele Spina,<sup>10</sup> and Alberto Orfao<sup>3</sup>

haematologica | 2014; 99(7)

Table 2. Cerebrospinal spinal fluid malignant cell analysis.

Cell detection method	FCM+	FCM-	Total	P2 (FCM vs. Cytology)
Diffuse large B-cell lymphoma				
Cytology+	9	2	11/246 (4.5%)	< 0.0001
Cytology-	33	202	235/246 (95.5%)	
Total	42/246 (17%)	204/246 (83%)	246	
Burkitt Lymphoma				
Cytology+	4	1	5/80 (6%)	0.02
Cytology-	9	66	75/80 (94%)	
Total	13/80 (16%)	67/80 (84%)	80	

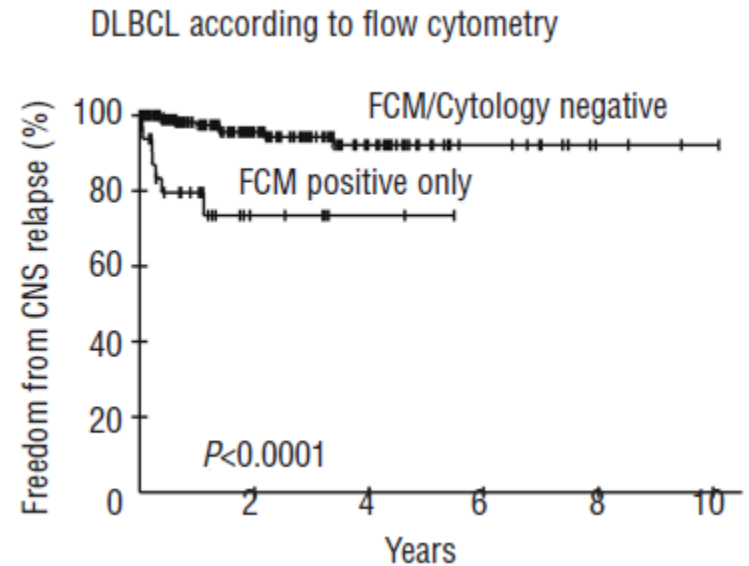
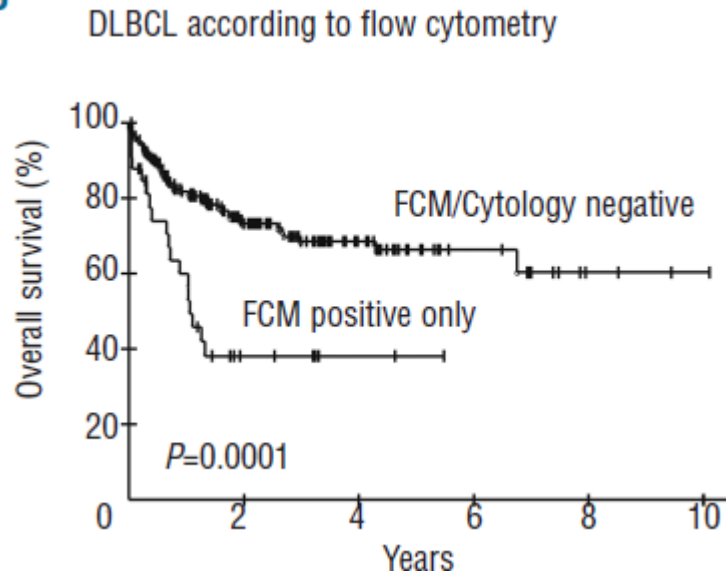
CC sólo detecta **26%** de los casos CMF+

CC sólo detecta **31%** de los casos CMF+

Este estudio valida previos trabajos en los que la CMF es más sensible que la CC

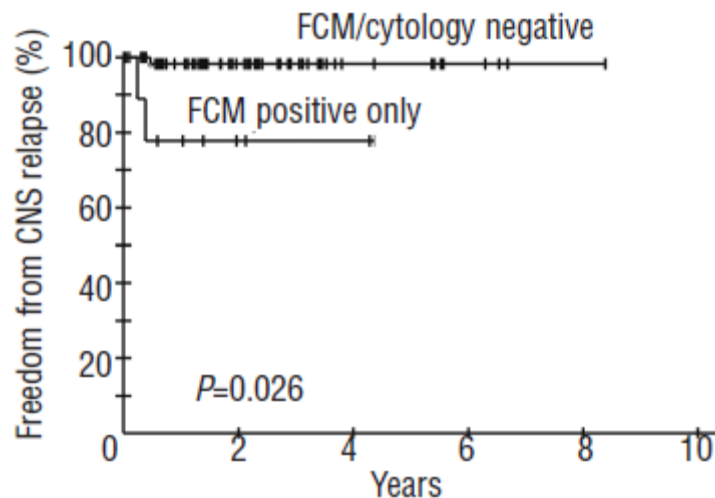
# Significado Clínico de la enfermedad leptomenígea oculta (CMF+/CC-)

**B**



**F**

Burkitt Lymphoma according to Flow Cytometry



# ESTUDIO DE MENINGITIS NEOPLASICA POR CMF

- Útil para la identificación y cuantificación de células tumorales de leucemia y LNH en LCR
- La CMF tiene mayor sensibilidad que la citología convencional (CC)
- Pacientes CC- y CMF+: son generalmente asintomáticos, tienen bajos recuentos celulares y bajos porcentajes de células tumorales en LCR

# ESTUDIO DE MENINGITIS NEOPLASICA POR CMF

- **Síntomas clínicos** asociados a infiltración de SNC:
  - CMF+/CC+: **95%**
  - CMF+/CC-: **58%** ( $p < 0.05$ )
- **Pleiocitosis** en LCR:
  - CMF+/CC+: **84%**
  - CMF+/CC-: **25%** ( $p < 0.05$ )
- CMF es útil para la detección temprana de **células tumorales** en LCR antes de la aparición de síntomas clínicos.

# ESTUDIO DE MENINGITIS NEOPLASICA POR CMF

	CMF	CITOLOGIA
Sensibilidad	96%	73%
Especificidad	97%	94%
Valor predictivo positivo	96%	88%
Valor predictivo negativo	97%	76%

# ESTUDIO DE MENINGITIS NEOPLASICA POR CMF

- CMF es útil en casos en los que la **CC** es reportada como "sospechosa" o "atípica".
- Necesaria la combinación de marcadores (>4 fluorescencias: **ACTUALIDAD** 8 **FLUORESCENCIAS**)
- Se requieren futuros **Consensos** para definir paneles de anticuerpos, procesamiento técnico de la muestras, definir aplicabilidad clínica de la **CMF**. Recomendación: **Usar las dos técnicas**.



# Compromiso de SNC en LLA

- Niños <5% y adultos 10% en el momento del diagnóstico.

-Criterios de compromiso en SNC:

- a) **CNS1 (Bajo Riesgo)**: Ausencia de blastos en LCR con <5 WBC/ul
- b) **CNS2 (Riesgo intermedio)**: Presencia de blastos en LCR con <5 WBC/ul
- c) **CNS3 (Alto Riesgo)**: Muestra no traumática + blastos +  $\geq 5$  WBC/ul o presencia de masa cerebral o parálisis de nervios craneales con blastos en LCR

# Compromiso de SNC en LLA

- Probabilidad de supervivencia a 5 años libre de leucemia en SNC:

c

- a) CNS1: 96%
- b) CNS2: 87%
- c) CNS3: 74%

- Probabilidad de supervivencia a 5 años:

- a) CNS1: 75%
- b) CNS2: 49%
- c) CNS3: 53%

Davis L and Westerman D. Leukemia & Lymphoma 2014.

- CMF mayor sensibilidad vs. CC en 2 cohortes separadas: 86% y 91% vs. 67% y 43%.

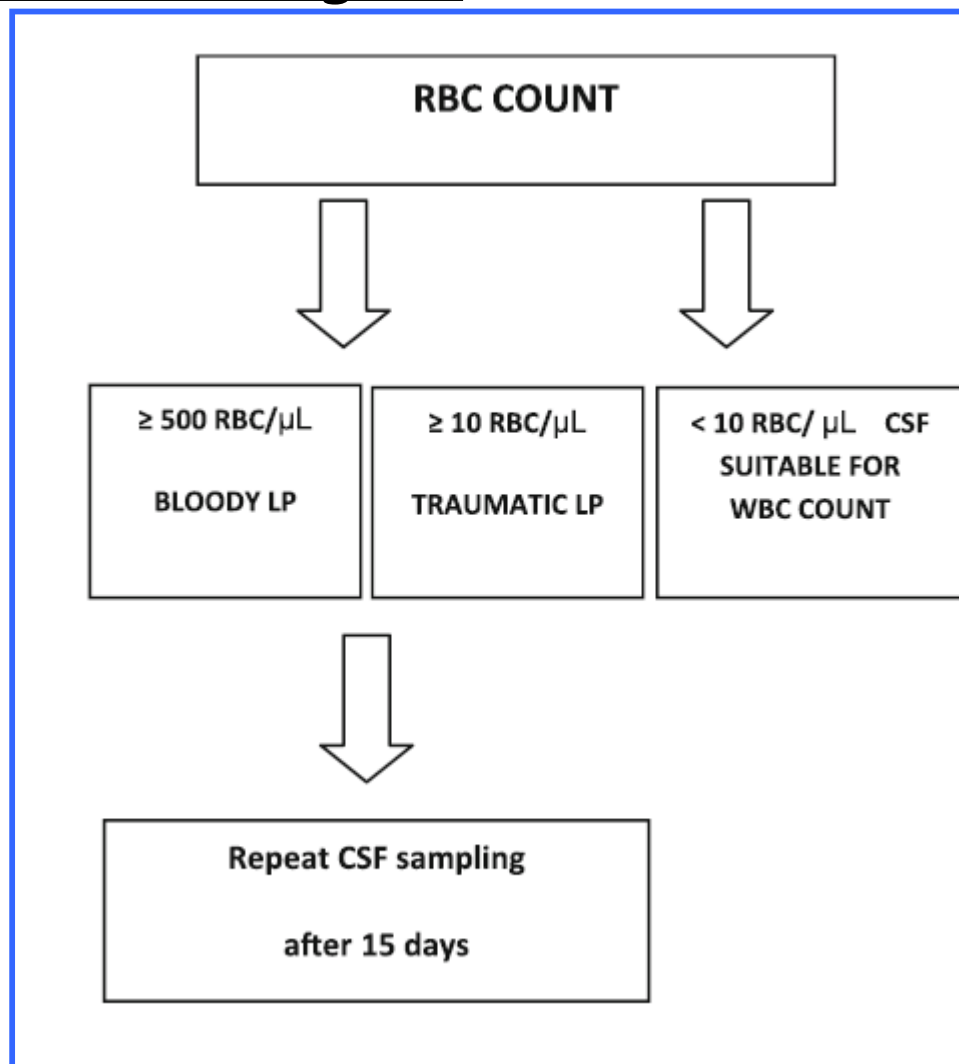
Subira D et al. Br J Haematol 2001.

Sayed et al. Leuk Res 2009.

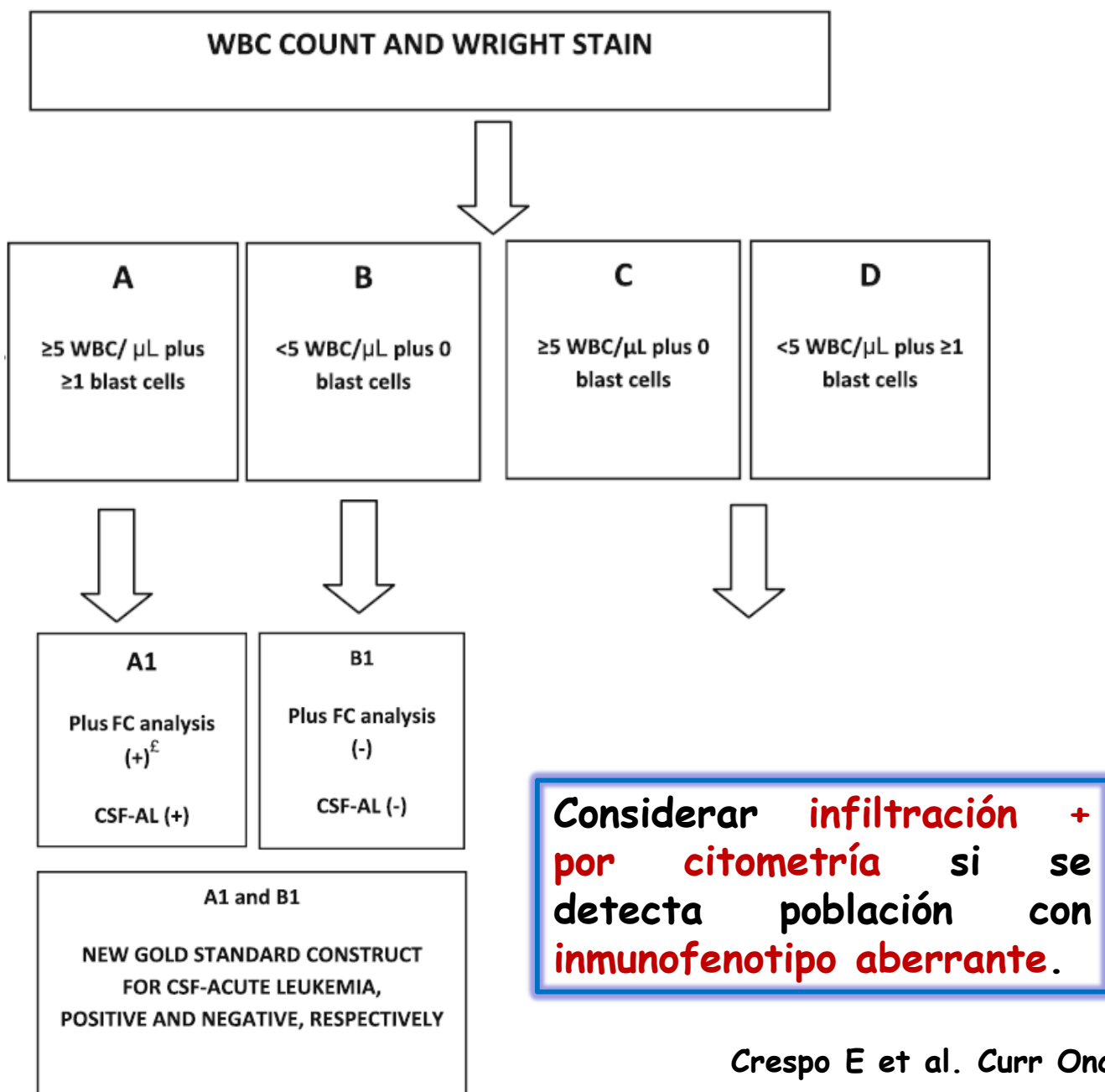
# Algoritmo propuesto para el estudio de infiltración de LCR en leucemia aguda

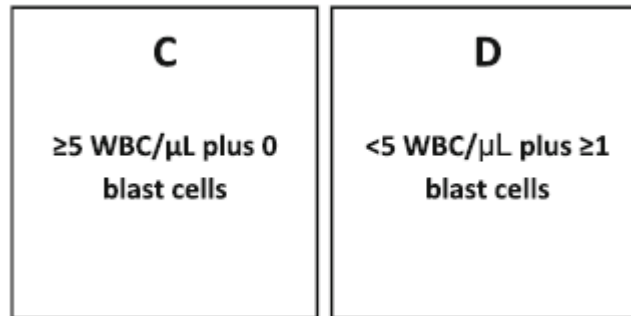
Punción lumbar traumática o punción lumbar sangrienta :  
Cuando hay  $\geq 10$  GR/ $\mu$ L y  $\geq 500$  GR/ $\mu$ L, respectivamente.

En pacientes pediátricos con LLA la incidencia de PL traumática o PL sangrienta es de 29% y 10%, respectivamente.



# Algoritmo propuesto para el estudio de infiltración de LCR en leucemia aguda





### INDETERMINATE ZONE

**C1= C plus FC (+):**

Consider minimal residual disease

**C2= C plus FC (-):**

Consider differential diagnosis, particularly chronic infection i.e. tuberculosis, viral. Or ITCT-induced inflammation

**D1= D plus FC (+):**

Consider minimal residual disease.  
Repeat work-up searching for an increase in blasts or an FC-abnormal population

**D2= D plus FC (-):**

Consider activated lymphocytes mimicking blasts. Repeat FC analysis.

Patients with indeterminate zone-CSFs (C1-D2) should be included in research protocols designed for close follow-up and searching for overt relapse with MRI studies, increasing WBC-abnormal population by PCR analysis or repeating FC analysis and WBC counts in CSF samples.

Indeterminate zone-CSFs should not be taken into account when making treatment decisions in daily clinical practice.

# Aplicación de protocolo estandarizado de LCR por CMF en neoplasias hematológicas:

## Flow Cytometric Immunophenotyping of Cerebrospinal Fluid

Jaco Kraan,<sup>1</sup> Jan W. Gratama,<sup>1</sup> Corinne Haioun,<sup>2</sup> Alberto Orfao,<sup>3</sup> Anne Plonquet,<sup>4</sup> Anna Porwit,<sup>5</sup> Sandra Quijano,<sup>3</sup> Maryalice Stetler-Stevenson,<sup>6</sup> Dolores Subira,<sup>7</sup> and Wyndham Wilson<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

<sup>2</sup>Service d'Hématologie Clinique, Hospital Henri Mondor, Créteil, France

<sup>3</sup>CSIC, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>4</sup>Immunologie Biologique, Hospital Henri Mondor, Créteil, France

<sup>5</sup>Department of Pathology, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

<sup>6</sup>Flow Cytometry Unit, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

<sup>7</sup>Department of Hematology, Jiménez Díaz Foundation, Madrid, Spain

<sup>8</sup>Center for Cancer Research, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

*Current Protocols in Cytometry* 6.25.1-6.25.16, July 2008



## CMF 3, 4, 6 y 8 fluorescencias

**Table 6.25.2** Six-Color Immunophenotyping Panel<sup>a</sup>

Laser		Blue (488 nm)				Red (635 nm)	
Query	Tube no.	FITC	PE	PCX	PEC7	APC	APC7
Unknown	1	8 + $\lambda$	56 + $\kappa$	4+19	3	38	45
B	1	$\lambda$	CDX/IgX	19	10	$\kappa$	45
T	1	5	7	45	4	8	3
AL	1	34	7	45	33	10	19
ALL	1	5	7	45	10	34	19
AML	1	34	117	45	33	133	DR
MM	1	38	138	45	56	20	19

<sup>a</sup>Abbreviations: AL, acute leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; APC, allophycocyanin; APC7, APC-Cy7; B, B cell lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukemia; FITC, fluorescein isothiocyanate; MM, multiple myeloma; PB, Pacific blue; PE, phycoerythrin; PE-TR, PE-Texas red; PCX, PE-cyanin (Cy)5 (PEC5) or PE-Cy5.5 or peridinin chlorophyll protein (PerCP) or PerCP.CY5.5; PEC7, PE-Cy7; PO, Pacific orange; T, T cell lymphoma.

# EuroFlow antibody panels for standardized $n$ -dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes

JJM van Dongen<sup>1</sup>, L Lhermitte<sup>2</sup>, S Böttcher<sup>3</sup>, J Almeida<sup>4</sup>, VHJ van der Velden<sup>1</sup>, J Flores-Montero<sup>4</sup>, A Rawstron<sup>5</sup>, V Asnafi<sup>2</sup>, Q Lécrovisse<sup>4</sup>, P Lucio<sup>6</sup>, E Mejstrikova<sup>7</sup>, T Szczepański<sup>8</sup>, T Kalina<sup>7</sup>, R de Tute<sup>5</sup>, M Brüggemann<sup>3</sup>, L Sedek<sup>8</sup>, M Cullen<sup>5</sup>, AW Langerak<sup>1</sup>, A Mendonça<sup>6</sup>, E Macintyre<sup>2</sup>, M Martin-Ayuso<sup>9</sup>, O Hrusak<sup>7</sup>, MB Vidriales<sup>10</sup> and A Orfao<sup>4</sup> on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708)

Leukemia (2012) **26**, 1908–1975

## SECTION 3. SMALL SAMPLE TUBE (SST)

AW Langerak<sup>1</sup>, L Martin-Martin<sup>2</sup>, J Almeida<sup>2</sup>, J Flores-Montero<sup>2</sup>, M Cullen<sup>3</sup>, E Mejstrikova<sup>4</sup>, D Tielemans<sup>1</sup>, J Vermeulen<sup>1</sup>, HK Wind<sup>1</sup>, VHJ van der Velden<sup>1</sup>, A Orfao<sup>2</sup> and JJM van Dongen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands; <sup>2</sup>USAL, Salamanca, Spain;

<sup>3</sup>UNIVLEEDS, Leeds, UK and <sup>4</sup>DPH/O, Prague, Czech Republic

**“Sreening” de linfoma en muestras de LCR y humor vítreo (LNH oculo-cerebrales)**

**- PIOL: 60-85% desarrollan LNH SNC en un periodo de 2-2,5 años**

**Objetivo: Obtener la máxima información de muestras con un número mínimo de células**

# 11 anticuerpos en 8 fluorescencias + Forward Scatter + Side Scatter

Table 5. Composition of SST for detection of lymphoid cells<sup>a</sup>

13 parámetros

Fluorochromes and markers							
PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CD20	CD45	CD8 and Smlgλ	CD56 and Smlgκ	CD4	CD19	SmCD3 and CD14	CD38

Abbreviations: APC, allophycocyanin; Cy7, cyanin7; FITC, fluorescein isothiocyanate; H7, hilite7; PacB, pacific blue; PacO, pacific orange; PE, phycoerythrin; PerCPCy5.5, peridinin–chlorophyll–protein–cyanin5.5; Sm, surface membrane; SST, small sample screening tube. <sup>a</sup>Further information about markers and hybridomas is provided in the Appendix.

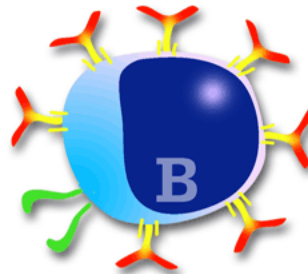
## CD45: marcador pan-leucocitario

### Linfocitos T



CD45  
CD3  
CD4  
CD8

### Linfocitos B



CD45  
CD19  
CD20  
Kappa  
Lambda

### Células NK



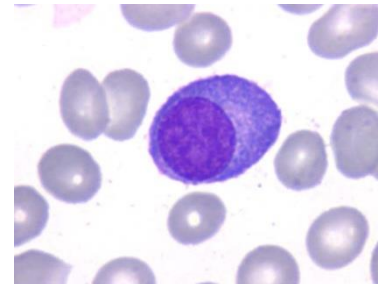
CD45  
CD56

### Monocitos



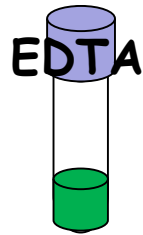
CD45  
CD14

### Células plasmáticas



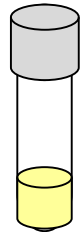
CD45  
CD38  
CD19

# Validación del tubo SST en muestras de LCR y biopsias vítreas:

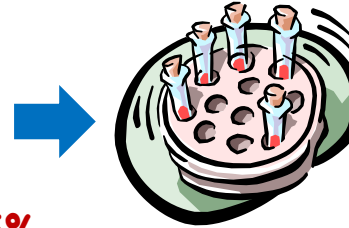


Recolección de las muestras  
en tubos con **Transfix**  
(Tubes&Transfix, Immunostep SL, Salamanca)

ó



Tubos con medio de cultivo + **BSA 0.5%**  
ó medio + **SFB 10%**



Marcaje 1/3  
de la muestra

Pellet  
celular

+

PBS

+

**BSA 0.5%**

**Table 6.** Normal and reactive leukocyte populations in 120 CSF and 21 vitreous biopsies without evidence for lymphoma

Group of samples	% B-cells	Smlgκ/Smlgλ ratio	% T-cells	CD4/CD8 ratio	% Monocytes	% Neutrophils <sup>a</sup>	% Other undefined events
CSF (n = 120)	2.0 (0-32)	1.4 (1.0-3.0)	50.8 (0-100)	1.8 (0.1-10.9)	2.1 (0-17)	15 (0-99)	31.7 (0-100)
CSF (MS cohort) (n = 15)	1.1 (0-4)	1.3 (1.0-2.5)	48.2 (0-89)	2.8 (1.7-7)	3.6 (0-14)	23 (0-99)	21.9 (0-100)
CSF (other HM suspicion) (n = 9) <b>LA y LH</b>	0.2 (0-1)	NA	40.8 (0-100)	1.2 (0.2-3.5)	0	9 (0-14)	49.8 (0-100)
CSF (lymphoma suspicion) (n = 96)	4.8 (0-32)	1.4 (1.0-3.0)	63.4 (0-100)	1.7 (0.1-10.9)	2.6 (0-17)	13 (9-59)	23.4 (0-100)
Vitreous fluid (n = 21)	0.5 (0-4)	NA	51.7 (3-100)	2.1 (0.3-49)	2.6 (0-14)	18 (0-53)	14.1 (0-100)

Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; HM, hematological malignancy; MS, multiple sclerosis; NA, not applicable due to lack of B-cells in most samples; Sm, surface membrane. Results are expressed as mean value and range between brackets. <sup>a</sup>Cells that cluster based on FSC<sup>int</sup>/SSC<sup>high</sup>/CD45<sup>lo</sup> can be considered as neutrophilic granulocytes (see also Discussion). NA, not applicable because of too few B-cells.

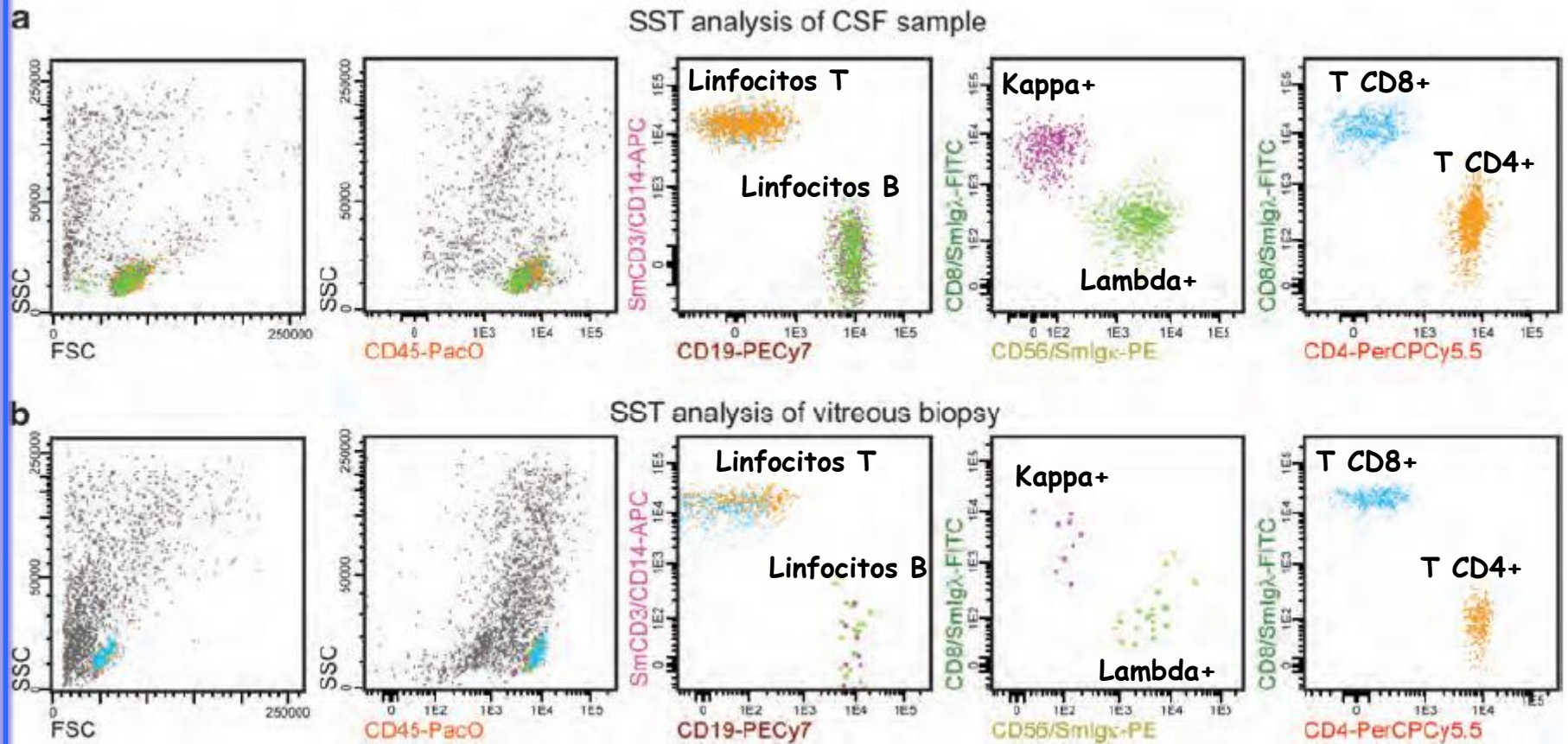
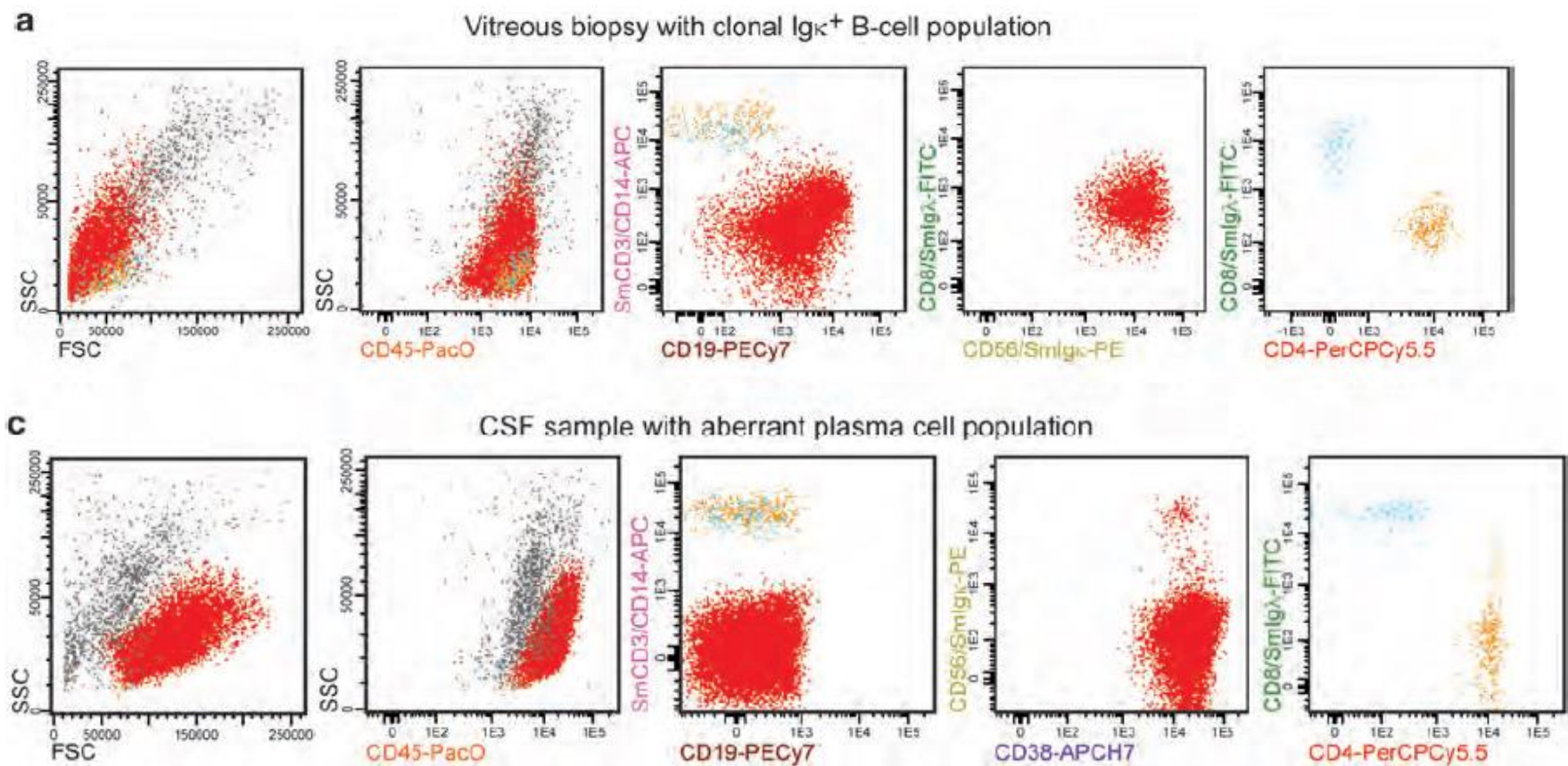




Table 7. SST results of 149 pauci-cellular samples

<i>Suspected lymphoma localized in CSF (n = 115)</i>	
Aberrant/clonal B-cell populations <sup>a</sup> (1 CLL, 1 BL, 1 FL, 1 MCL, 2 DLBCL, 1 B-cell lymphoma, 2 unknown)	9/115 (7.8%)
Aberrant T-cell populations (T-cell lymphoma, PTLD)	2/115 (1.7%)
<i>Suspicious of other hematological malignancies in CSF (n = 11)</i>	
Aberrant plasma cell populations	2/11 (18.1%)
<i>Vitreous biopsy (n = 23)</i>	
Aberrant/clonal B-cell populations	2/23 (8.7%)
Total	15/149 <sup>b</sup> (10.0%)

13/13: citología negativos





## LYMPHOID NEOPLASIA

### Contribution of cerebrospinal fluid sCD19 levels to the detection of CNS lymphoma and its impact on disease outcome

Carmen Muñiz,<sup>1</sup> Lourdes Martín-Martín,<sup>1</sup> Antonio López,<sup>1</sup> Blanca Sánchez-González,<sup>2</sup> Antonio Salar,<sup>2</sup> Julia Almeida,<sup>1</sup> Juan-Manuel Sancho,<sup>3</sup> José María Ribera,<sup>3</sup> Cecilia Heras,<sup>4</sup> Francisco Javier Peñalver,<sup>5</sup> Marta Gómez,<sup>6</sup> Eva González-Barca,<sup>7</sup> Natalia Alonso,<sup>8</sup> Belén Navarro,<sup>9</sup> Teresa Olave,<sup>10</sup> Francisco Sala,<sup>11</sup> Eulogio Conde,<sup>12</sup> José Antonio Márquez,<sup>13</sup> Elena Cabezudo,<sup>14</sup> Antonia Cladera,<sup>15</sup> María García-Malo,<sup>16</sup> María Dolores Caballero,<sup>1</sup> and Alberto Orfao,<sup>1</sup> for the Spanish Group for the Study of Central Nervous System Disease in Non-Hodgkin Lymphoma

(*Blood*. 2014;123(12):1864-1869)

-**LNH-B agresivos CMF-** pueden desarrollar enfermedad en SNC después del diagnóstico y particularmente cuando no han recibido profilaxis en SNC.  
Wilson W et al 2013.

- Casos con **compromiso del parénquima cerebral** pueden ser CMF- y CC- porque las **células tumorales no alcanzan el LCR** en números detectables.  
Chamberlain MC et al Semin Oncol 2009.

- Se han reportado productos de células tumorales en LCR: **Proteínas (sCD27), RNA, DNA, miR (miR-19b, miR-21, miR-92a) en pacientes con Linfoma en SNC.**

Baraniskin A et al Blood 2011.

Roy S et al J Clin Oncol 2008.

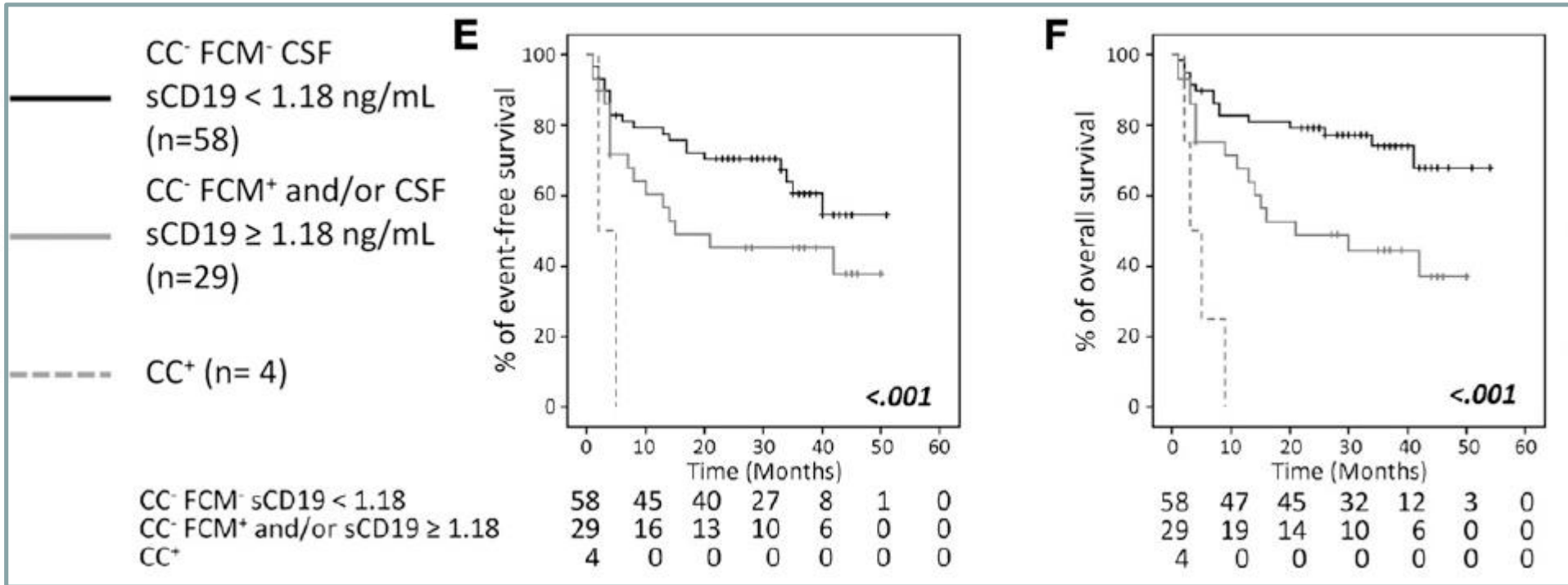
- **Objetivo:** Evaluar en LCR (estabilizado con Transfix) 13 marcadores\* solubles asociados a célula B y su contribución al diagnóstico de linfoma en SNC en 91 pacientes con DLBCL y 22 pacientes con BL.

\*CD19, CD22, CD24, CD38, CD44, CD72, kappa, lambda, IgA, IgM, IgG,  $\beta$ 2-m.



- **Niveles elevados de sCD19** ( $\geq 1.18$  ng/mL) se asocian con:

- DLBCL CMF+/CC+ ( $p < .001$ ) y CMF+/CC- ( $p < .02$ )
- DLBCL localizado en parénquima por resonancia magnética ( $p = .007$ )
- IPI elevado ( $p = .05$ ) y peor estado general ( $p = .04$ )
- Predice menor supervivencia total y menor supervivencia libre de eventos en DLBCL y BL

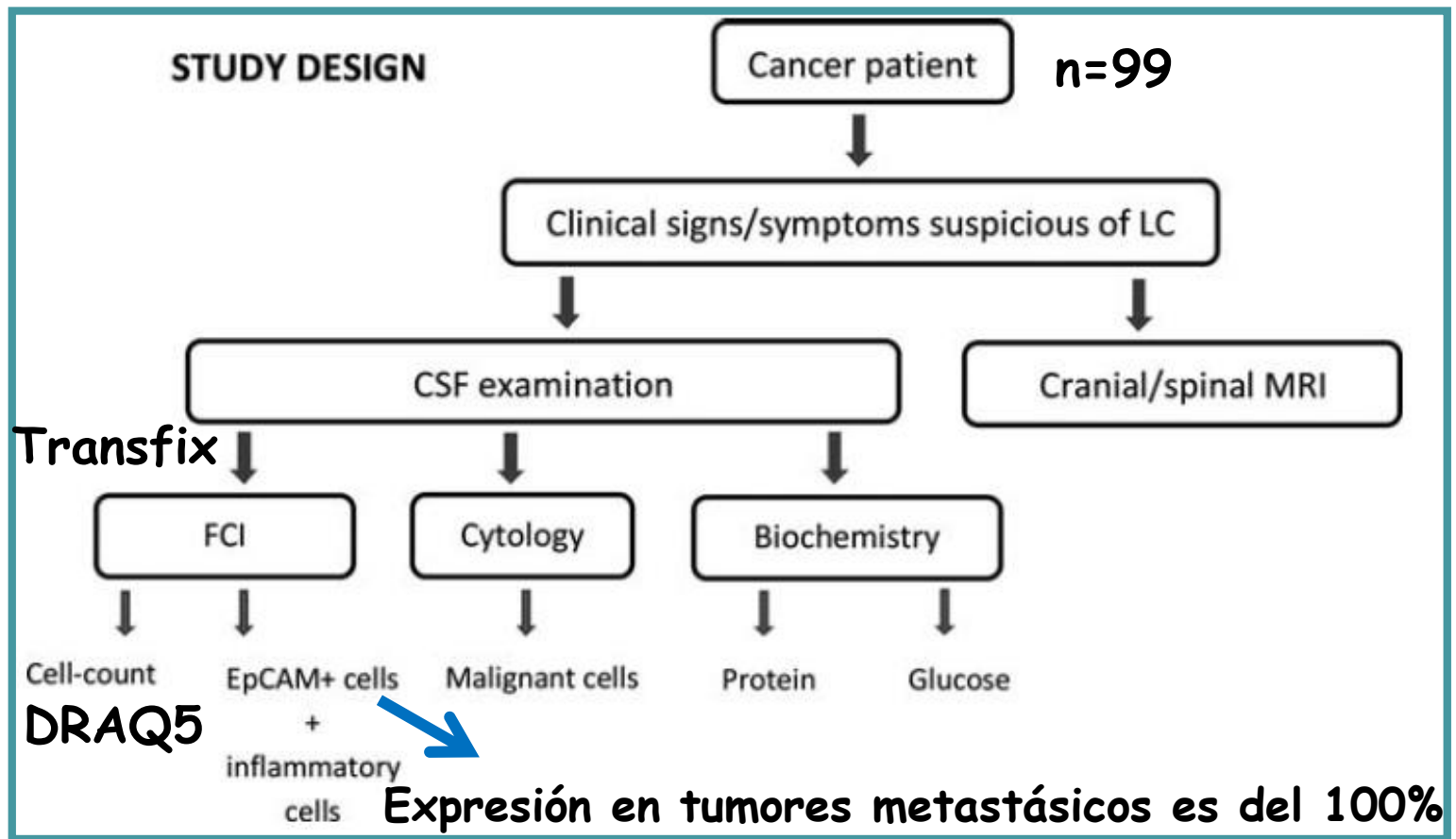


- sCD19 es un marcador sensible para la detección de compromiso por linfoma en SNC en el diagnóstico de rutina y en combinación con inmunofenotipo por CMF

# Role of flow cytometry immunophenotyping in the diagnosis of leptomeningeal carcinomatosis

Subirá D et al.

- **CL: 5-10%** de pacientes con tumores sólidos y es de mal pronóstico (supervivencia 3-6 meses en pacientes tratados con quimioterapia).
  - **CC: 45%** de los pacientes tienen un resultado inicial negativo en LCR.
  - La sensibilidad de la CC incrementa al 90% cuando se estudia un alto numero de muestras de LCR.
- 
- **Objetivo:** Explorar la contribución de la CMF en la detección de enfermedad leptomeningea en pacientes con tumores sólidos.



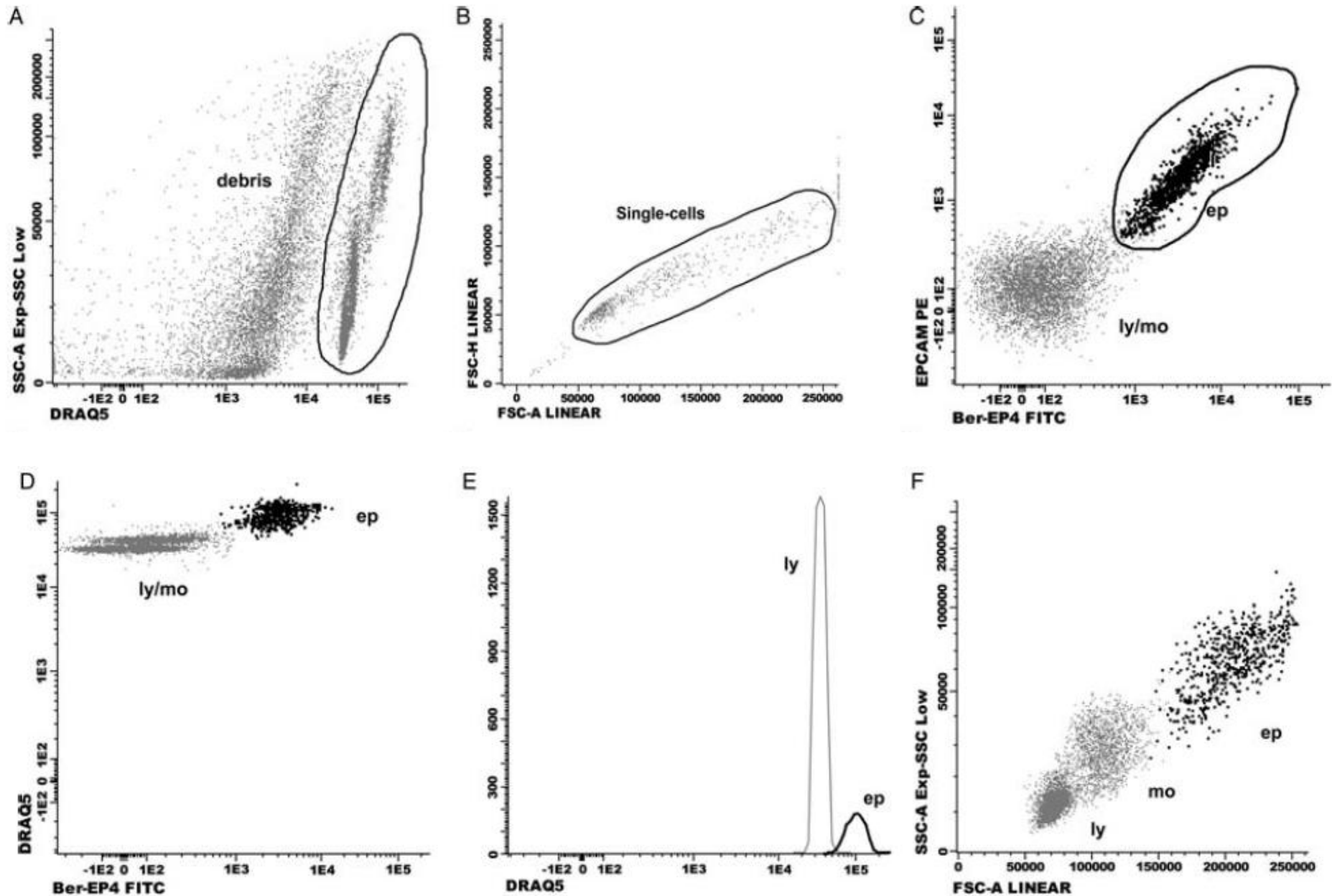
- Se encontró alta correlación entre CC y CMF (k=0.83)

**Table 3.** Sensitivity, specificity, PPV and NPV for CSF cytology and FCI evaluation

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Cytology	65.3 (52.0–78.6)	100 (100–100)	100 (100–100)	60.5 (45.8–75.1)
FCI	75.5 (63.5–87.6)	96.1 (88.8–100)	97.4 (92.3–100)	67.6 (52.5–82.7)

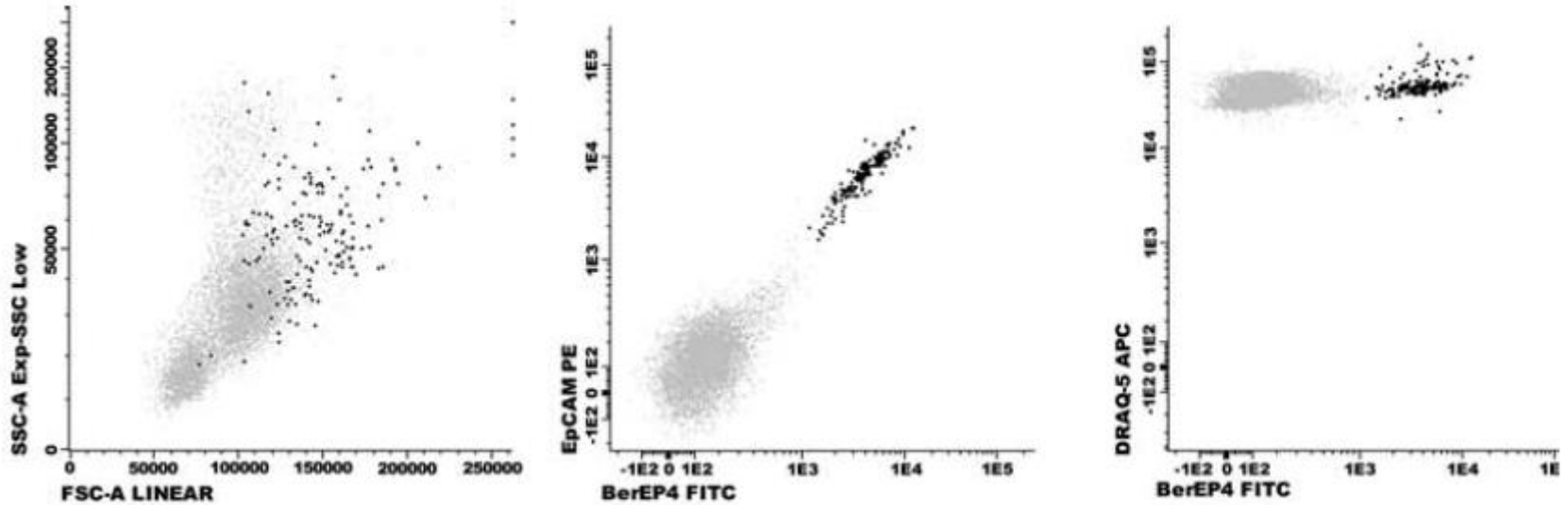
Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value. FCI, flow cytometry immunophenotyping.

# Muestra de LCR EpCAM+: Estrategia de análisis



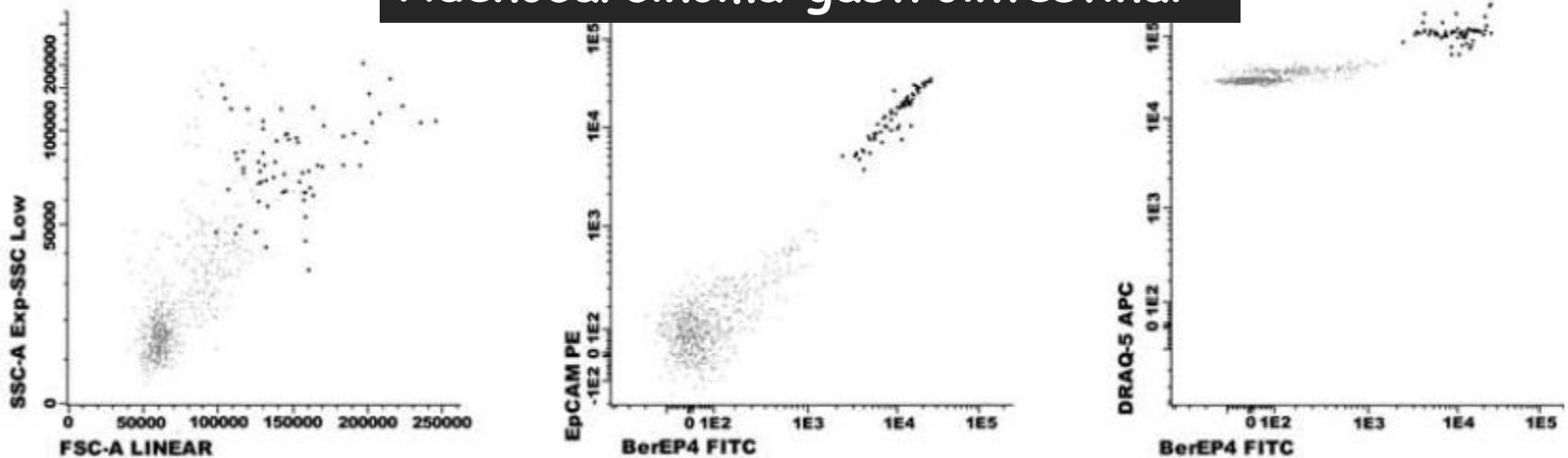


## Adenocarcinoma de mama



Volumen de LCR: 2.3 ml; N° Células: 11/mm<sup>3</sup>; Células Epiteliales: 2%

## Adenocarcinoma gastrointestinal



Volumen de LCR: 2.1 ml; N° Células: 1/mm<sup>3</sup>; Células Epiteliales: 5%



GRACIAS

# Biomarcadores en LCR empleados para predecir meningitis neoplásica

Parámetros estándar de infiltración tumoral en LCR (Chamberlain M 2006)	Frecuencia
Recuento de leucocitos $>4/\text{mm}^3$	57-65%
Concentración de proteínas $>50 \text{ mg/dL}$	73-86%
Concentración de glucosa $<60\text{mg/dL}$	31-55%
Citología positiva	45-73%

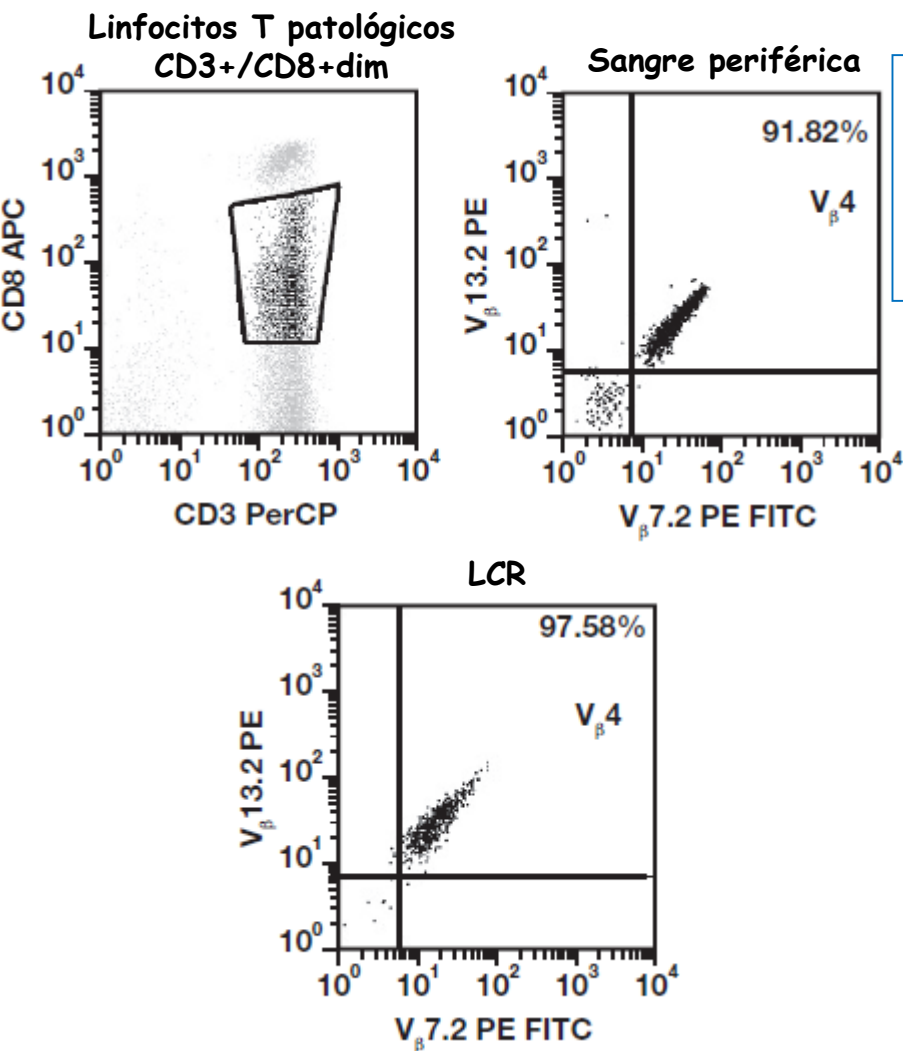
Autor	Tipo de Tumor	Marcadores
Brandsma D. J. Neurol. 2006	Ca. Seno, Ca. Pulmón, Ca. Ovario, Melanoma, LNH.	Glucosa, proteínas, IL-8 (CXCL-8), PARC (CCL18), IP10 (CXCL10), CXCL12
van de Langerijt Neurology. 2006.	Ca. Pulmón Melanoma	Índices LCR/Suero VEGF/tPA/uPA/TGF $\beta$
Friedberg Cancer. 1998.	Melanoma, Ca. Seno, Carcinoma pulmonar de células pequeñas	MMP2 MMP9

**VARIACION EN LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE ESTOS MARCADORES**

# Flow Cytometric Immunophenotypic Assessment of T-Cell Clonality by V $\beta$ Repertoire Analysis in Fine-Needle Aspirates and Cerebrospinal Fluid

Prashant Tembhare, MD,<sup>1</sup> Constance M. Yuan, MD, PhD,<sup>1</sup> John C. Morris, MD,<sup>3</sup>  
John E. Janik, MD,<sup>3</sup> Armando C. Filie, MD,<sup>2</sup> and Maryalice Stetler-Stevenson, MD, PhD<sup>1</sup>

Am J Clin Pathol 2012;137:220-226



1. Análisis del fenotipo y repertorio TCRV $\beta$  en SP
2. Selección de marcadores en LCR
3. La presencia de abundantes linfocitos T reactivos en LCR podría dificultar el análisis de Células T clonales

Table 3  
Flow Cytometric and Cytomorphologic Detection of T-Cell Neoplasia

Flow Cytometry	Cytomorphology			Total No. of Cases
	Positive	Indeterminate <sup>*</sup>	Negative	
FNA specimens				
Positive	4	4	0	8
Negative	0	0	0	0
Total No. of cases	4	4	0	8
CSF specimens				
Positive	1	2	3	6
Negative	0	2	0	2
Total No. of cases	1	4	3	8

<sup>\*</sup> Indeterminate, “suspicious” or atypical morphologic features.

# Flow Cytometric Detection of Liposomal Cytarabine in Cerebrospinal Fluid of Patients Treated with Intrathecal Chemotherapy

Alessandra Stacchini,\* Anna Demurtas, and Sabrina Aliberti

Department of Pathology, Flow cytometry unit, Molinette Hospital, via Santena 7, 10126 Turin, Italy

Cytometry B Clin Cytom. 2012



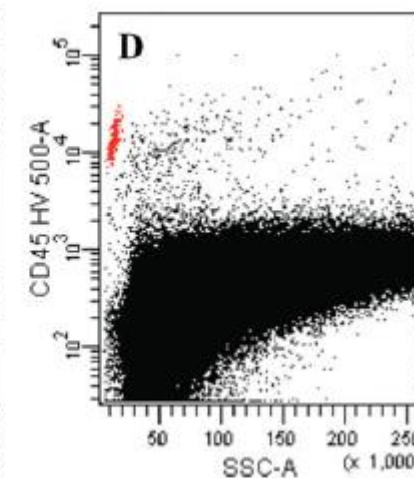
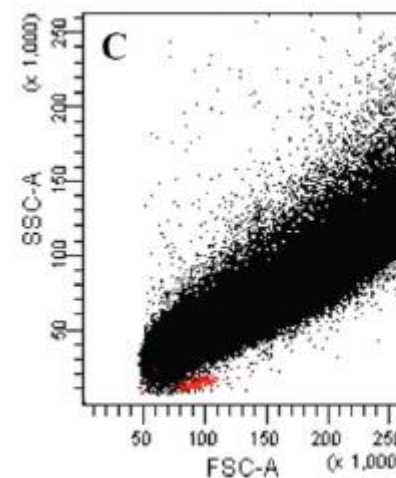
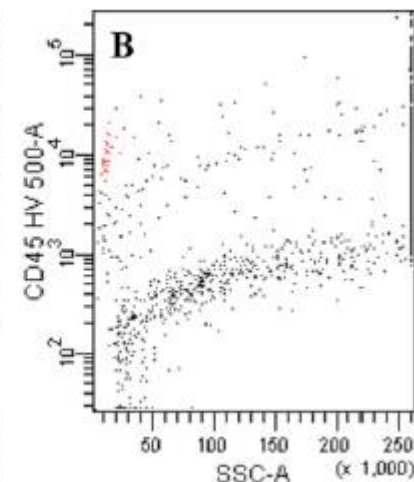
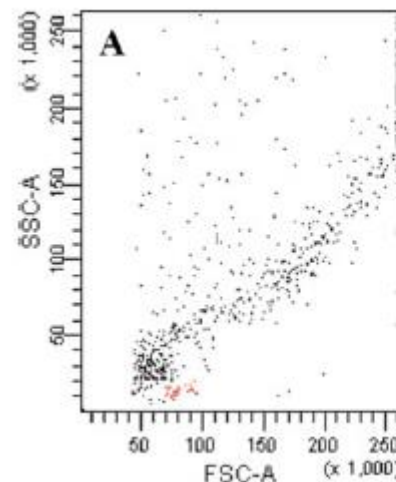
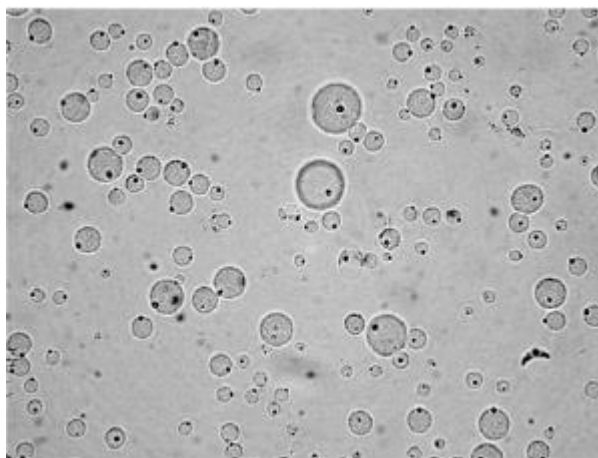
liposomas



linfocitos

-Analizan 114 muestras de LCR con tumores hematológicos: 10 muestras (LNH agresivos) con eventos atípicos en FSC vs SSC, CD45-, CD235a-

- Estos pacientes fueron tratados con Citarabina liposomal (citarabina libre es detectable por más de 14 días después de la administración, liposomas miden 3-30 um)



DETECCIÓN DE INFILTRACIÓN DE SNC EN  
LNH-B AGRESIVO:  
CMF versus Citología (n=123)

		CMF	
		-	+
Citología	-	95/123 (77%)	17/123 (14%)
	+	1/123 (1%)*	7/123 (6%)
	Sospechoso	-	3/123 (2%)

\*Negatividad confirmada por métodos inmunohistoquímicos